

Proposition d'une méthode pour  
l'évaluation de la pollution  
et de la toxicité des sédiments :  
Application pour un site  
sur la rivière Urtenen dans le canton  
de Berne

Projet de master

15 janvier 2010

Science et ingénierie de l'environnement

Etudiant : Romuald Curdy

Superviseurs : Dr Nathalie Chèvre et Dr Luca Rossi

## Résumé

Le compartiment benthique est une zone essentielle de l'écosystème riverain. Comme les polluants, principalement organiques, se concentrent dans les sédiments fins et organiques, leurs concentrations sont plus élevées que dans la colonne d'eau. Cette situation peut causer une dégradation des communautés benthiques alors que la pollution dans l'eau est basse. Il y a un vide actuellement dans le droit suisse pour évaluer et protéger la qualité des sédiments.

L'objectif de ce rapport est de proposer une méthode d'évaluation de la pollution et de la toxicité des sédiments par une approche par faisceau de preuves (TRIAD) composée d'analyses physico-chimiques des polluants potentiels et des facteurs influençant leur biodisponibilité, de l'utilisation d'un indice biologique IBGN (indice biologique global normalisé) pour qualifier la diversité et la dégradation des communautés benthiques et d'une batterie de tests écotoxicologiques pour confirmer le risque toxique.

Ensuite, nous avons appliqué cette méthode à un site sur la rivière Urtenen près de Berne (CH) potentiellement contaminés par deux sources liées aux événements orageux : les eaux de ruissellement d'un tronçon d'autoroute et un déversoir d'orage de la ville de Schönbühl.

Notre étude montre qu'il y a effectivement une pollution mesurée par des HAPs (Hapt : 10 ppm), des PCBs (PCBt : 168 ppb) et des métaux lourds (principalement le cuivre et le zinc avec respectivement 314 ppm et 320 ppm). La comparaison de ces concentrations avec les valeurs de recommandation pour la qualité des sédiments (les valeurs de TEC sous laquelle un effet est rare et de PEC au-dessus de laquelle un effet est souvent observé) dérivées par MacDonald et al. (2000), indique qu'un risque toxique est possible pour les communautés benthiques. Ensuite, l'indice biologique indique que les communautés benthiques sont dégradées dans la rivière Urtenen, avec un indice sur l'effet de la pollution de l'eau et/ou des sédiments. Enfin, les bioessais montrent très peu de toxicité pour l'eau de porosité et l'extrait aqueux. Par contre l'extrait organique montre une toxicité pour le test Microtox® ( $IC_{50}$  : 8.1 grammes d'eq-sédiment sec par litre) et sur *Daphnia magna* ( $EC_{50}$  : 9.8 grammes grammes d'eq-sédiment sec par litre). Le mélange de polluants organiques est donc relativement toxique si il est entièrement biodisponible, ce qui n'est pas le cas pour des sédiments *in situ*.

Les conclusions de cette approche par faisceau de preuve sont : (1) notre site est pollué principalement par des polluants organiques et des métaux lourds, (2) Il y a une dégradation des communautés benthiques dans la rivière Urtenen mais (3) la causalité entre les deux points ne peut être prouvée sans l'utilisation de bioessais en phases solides sur des espèces benthiques.

Pour finir, l'approche faisceau de preuve proposée permet de confirmer la pollution des sédiments mais ne permet pas encore de comprendre la biodisponibilité des polluants pour les biocénoses benthiques.

## Abstract

The benthic zone is essential for the river ecosystem but it is hardly taken into account in the swiss law. Anthropogenic pollutants are concentrated in sediments because of the very fine particule and their organic carbon content end in sediment with the adsorbed contaminants. The benthic organism communities can therefore be affected by that pollution, even if concentrations of pollutants in the column water is low.

The aim of this report is to propose a method to evaluate the contamination and the toxicity of the sediments.

This method was used to assess the sediment in the river Urtenen (near Bern, CH) because of the presence of two potential polluted sources of contamination for the sediments. In both situations, the pollution is occurring during storm events : one is the run-off from a highway section and the other is the combined sewer overflow from a city, Schönbühl, with 15000 inhabitants.

Our method is based on the approach "weight of evidence" composed of physico-chemical analysis, biological index based on the diversity of benthic communities and a pack of bioassays with pelagic species.

The results show that one site is contaminated to PAHs (PAHt : 10 ppm), PCBs (PCBt : 168 ppb) and metals (mainly copper and zinc with respectively 314 ppm and 320 ppm). The comparison of this concentrations with the values of sediments quality guidelines (the Threshold Effect Concentration (TEC) and the Probable Effect Concentration (PEC)) derived by MacDonald and al.(2000) shows that there is a possible toxic hazard for the benthic communities. The Biological index (IBGN is the french Normalized Global Biological Index) shows a degradation of the benthic communities and gives indication of the causation with the pollutants concentrations. The bioassays with porosity water and aqueous extract show very little toxicity for both sites where as organic extract based bioassays show toxicity with Microtox® ( $IC_{50}$  : 8.1 grammes of eq-dry sediment per liter) and with *Daphnia magna* ( $EC_{50}$  : 9.8 grammes of eq-dry sediment per liter) for the most polluted site. So the mixture of organic pollutants shows hazard if they are fully bioavailable, but that is not the case for *in situ* sediments.

The conclusion for the weight of evidence approach is : (i) both sites are contaminated with pollutants, (ii) there is indication of the degradation of the benthic communities but, (iii) to prove the causation between both we need solid-phase bioassays with benthic organisms in order to elucidate the bioavailability of the pollutants mixture in sediments.

Finally, The approach proposed permit to assess succesfully the contamination of the sediments but is lacking proof-making tools about the toxicity of the sediments on the benthic zone, which must be an improvement aim for the future.

## Remerciements

Ce travail n'aurait pas pu être possible sans le soutien et les conseils de beaucoup de personnes envers lesquelles je dois une profonde reconnaissance.

Merci tout d'abord à Nathalie Chèvre pour ce sujet qui m'a permis d'approfondir un domaine qui m'intéressait depuis le début de mes études en environnement, mais surtout pour ces conseils avisés, sa motivation communicative et sa confiance. Merci aussi à Luca Rossi pour sa grande disponibilité et pour les moyens mis à disposition dans le laboratoire ECOL. Merci à Serge Santiago pour son engagement pour mon travail, pour la grande chance offerte de découvrir la pratique des tests écotoxicologiques et peut être surtout pour sa patience. Merci à Elmar Scheiwiller pour son intérêt et pour sa grande disponibilité.

Merci aussi à Hans-Rudolf Pfeifer pour son accueil au Centre d'analyse minéral, pour sa générosité et pour la possibilité des analyses qu'il m'a permis de faire. Merci aussi à Jean-claude Lavanchy et Morgane Tournier pour leurs aides pour les analyses par fluorescence X.

Merci à Jean-david Teuscher pour sa disponibilité et la quantité de questions auxquelles il a accepté de me répondre, pour son aide pour les analyses de métaux et la logistique des échantillonnages. Merci à Elena Rossel pour son aide sur les analyses de granulométrie. Merci à Htet Kyi Wynn pour les analyses d'ammonium, pour m'avoir laissé occuper son laboratoire et pour son pardon.

Merci à Felipe De Alencastro et Dominique Grandjean de m'avoir laissé utiliser leurs équipements au laboratoire central, et particulièrement à Rachel La Mendola et Virginie Brissonnette pour les analyses de HAPs, PCBs et soufre.

Merci à Jean-Luc Loizeau et à Philippe Arpagaus pour le prêt de la benne ponar sans laquelle l'échantillonnage n'aurait pas été possible.

Merci à Anne-Lise et Christian Mermet pour leur accueil très chaleureux à Môtiers, ainsi qu'à toute leurs famille.

Merci à aussi à Sami Goekce, Florence Mottaz, Bastien Pizza, Yoann Pfluger, Mickaël Hertig, Patrice Soom, Dominique Nüssbaum et Olivier Küng.

Merci enfin à mes parents et à mes frères et soeurs.



# Table des matières

<b>1</b>	<b>Introduction</b>	<b>10</b>
1.1	Question du rejet des eaux pluviales et Directive STORM . . . . .	10
1.2	Législation suisse liée aux sédiments . . . . .	10
1.3	Chimie des polluants dans les sédiments . . . . .	11
1.4	But du présent rapport . . . . .	11
<b>2</b>	<b>Proposition d'une méthode d'évaluation basée sur l'approche par faisceau de preuves</b>	<b>12</b>
2.1	Principe . . . . .	12
2.2	Approche par étape . . . . .	13
2.3	Echantillonnage . . . . .	19
2.3.1	Représentativité temporelle . . . . .	19
2.3.2	Représentativité spatiale . . . . .	19
2.3.3	Choix de la station . . . . .	19
2.3.4	Volume représentatif d'échantillon . . . . .	20
2.4	Analyses physico-chimiques . . . . .	20
2.4.1	Choix des polluants à analyser et des méthodes analytiques . . .	20
2.4.2	Introduction aux recommandations sur la qualité des sédiments .	21
2.4.3	Choix d'un système de recommandations . . . . .	21
2.5	Indice biologique . . . . .	22
2.5.1	Echantillonnage . . . . .	23
2.5.2	Calcul de l'Indice Biologique Globale Normalisé . . . . .	23
2.6	Tests écotoxicologiques . . . . .	23
2.6.1	Choix des organismes de tests . . . . .	25
2.6.2	Choix des phases et extraits d'essais . . . . .	26
2.6.3	Interprétation des données . . . . .	26
2.6.4	Calcul d'un indice SED-TOX . . . . .	29
<b>3</b>	<b>Application de cette méthode à un site à Schönbühl (Be)</b>	<b>30</b>
3.1	Description de la situation et intérêt de ce site . . . . .	30
3.2	Investigation préliminaire, données disponibles sur le site . . . . .	31
3.3	Choix des stations d'échantillonnage . . . . .	31
3.4	Pluviométries et débitmétrics . . . . .	33
3.5	Résultats des analyses physico-chimiques . . . . .	33
3.5.1	Granulométrie . . . . .	33
3.5.2	Représentativité du volume d'échantillonnage . . . . .	35
3.5.3	Soufre . . . . .	35
3.5.4	Ammonium . . . . .	36
3.5.5	Métaux lourds . . . . .	37
3.5.6	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques . . . . .	41
3.5.7	Polychloro-biphényles . . . . .	45
3.5.8	Conclusion pour les analyses de polluants et intégration à l'ap- proche par faisceau de preuve . . . . .	46

3.6	Résultat de l'indice biologique . . . . .	47
3.6.1	Méthode et choix des sites d'échantillonnages . . . . .	47
3.6.2	Résultat et discussion . . . . .	48
3.6.3	Conclusion pour l'indice biologique et intégration à l'approche par faisceau de preuve . . . . .	50
3.7	Résultats des tests écotoxicologiques . . . . .	51
3.7.1	Caractéristiques physico-chimiques des échantillons . . . . .	51
3.7.2	Bioessais Microtox® sur <i>Vibrio fischeri</i> . . . . .	51
3.7.3	Bioessais sur <i>Daphnia magna</i> . . . . .	53
3.7.4	Bioessais sur <i>Brachionus calyciflorus</i> . . . . .	53
3.7.5	Bioessais sur <i>Ceriodaphnia dubia</i> . . . . .	56
3.7.6	Bioessais sur <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> . . . . .	56
3.7.7	Bioessais sur <i>Lemna minor</i> . . . . .	56
3.7.8	Comparaison de la toxicité entre les deux sites . . . . .	58
3.7.9	Comparaison avec les résultats obtenues par Jonas Margot . . . . .	58
3.7.10	Application de l'indice SED-TOX . . . . .	61
3.7.11	Conclusion des tests écotoxicologiques et intégration dans l'ap- proche par faisceau de preuve . . . . .	64
3.8	Conclusion de l'approche par faisceau de preuve . . . . .	65
<b>4</b>	<b>Discussion sur l'approche TRIAD proposée et appliquée</b>	<b>67</b>
4.1	Sur le choix de l'approche TRIAD . . . . .	67
4.1.1	Approche par faisceau de preuve en simultanée ou "par valeur déclencheuse" . . . . .	67
4.1.2	Prolonger l'approche TRIAD . . . . .	68
4.2	Sur la méthode d'échantillonnage et de préparation des échantillons . . . . .	69
4.2.1	Représentativité temporelle . . . . .	69
4.2.2	Représentativité spatiale . . . . .	69
4.2.3	Fraction granulométriques des sédiments considérée . . . . .	70
4.3	Sur les recommandations pour la qualité des sédiments . . . . .	70
4.3.1	Méthode basée sur des sites de références . . . . .	70
4.3.2	Méthodes basée sur des relations entre polluants et toxicité ob- servée sur des espèces de référence . . . . .	71
4.4	Sur l'indices biologique . . . . .	71
4.5	Sur les tests écotoxicologiques . . . . .	71
4.5.1	Sur le choix des organismes d'essais . . . . .	71
4.5.2	Sur le choix des extraits pour les bioessais . . . . .	72
4.5.3	Sur l'indice SED-TOX . . . . .	72
<b>5</b>	<b>Conclusion et perspectives pour le développement d'une législa- tion suisse sur les sédiments</b>	<b>74</b>
<b>6</b>	<b>ANNEXES</b>	<b>75</b>
6.1	ANNEXE : Protocole d'échantillonnage et de stockage . . . . .	75
6.2	ANNEXE : Protocole pour le nettoyage de la vaisselle utilisée . . . . .	77
6.3	ANNEXE : Protocole pour la pré-centrifugation des sédiments . . . . .	77

6.4	ANNEXE : Protocole pour l'analyse des métaux par ICP-OES . . . . .	77
6.5	ANNEXE : Protocole pour l'analyse des métaux par fluorescence X . . .	78
6.6	ANNEXE : Protocole pour l'analyse des HAPs et des PCBs . . . . .	78
6.7	ANNEXE : Protocole pour l'analyse de l'ammonium . . . . .	80
6.8	ANNEXE : Protocole pour l'extraction organique et l'analyse du soufre élémentaire . . . . .	81
6.9	ANNEXE : Protocole pour la mesure de la granulométrie . . . . .	82
6.10	ANNEXE : Protocole pour l'extraction de l'eau interstitielle . . . . .	84
6.11	ANNEXE : Protocole pour l'extraction aqueuse . . . . .	84
6.12	ANNEXE : Calcul de l'indice SED-TOX . . . . .	85
6.13	ANNEXE : Protocole pour les bioessais Microtox® . . . . .	87
6.14	ANNEXE : Protocole pour les bioessais sur <i>Daphnia magna</i> . . . . .	87
6.15	ANNEXE : Protocole pour les bioessais chronique sur les <i>Brachionus</i> <i>calyciflorus</i> . . . . .	88
6.16	ANNEXE : Protocole pour les bioessais chroniques sur <i>Ceriodaphnia</i> <i>dubia</i> . . . . .	88
6.17	ANNEXE : Protocole pour les bioessais sur les algues vertes . . . . .	88
6.18	ANNEXE : Protocole pour les bioessais sur les lentilles d'eaux . . . . .	88
6.19	ANNEXE : Rapport des activités . . . . .	88
6.20	Volumes estimés de sédiments humides nécessaires . . . . .	88
6.21	Volume et type de sédiments pour chaque analyse et test . . . . .	89
6.22	Plan de travail . . . . .	89
	6.22.1 Pour le stockage des échantillons de sédiment . . . . .	90
	6.22.2 Pour le stockage des extraits . . . . .	90
6.23	Tests écotoxicologiques . . . . .	90
	6.23.1 Mesure des caractéristiques physico-chimiques des échantillons . . . . .	90
<b>7</b>	<b>Liste de matériel et réactifs</b>	<b>94</b>
7.1	Pour l'échantillonnage . . . . .	94
	7.1.1 Matériel . . . . .	94
7.2	Pour l'extraction . . . . .	94
	7.2.1 Matériel . . . . .	94
	7.2.2 réactifs chimiques . . . . .	94

## Table des figures

1	Les mécanismes qui modifient la forme et la distribution des polluants : source de l'image : <a href="http://www.sccwrp.org/view.php?id=291">http://www.sccwrp.org/view.php?id=291</a> . . . . .	11
2	Shéma de l'approche par étape proposée . . . . .	14
3	Exemple de courbe dose-effet . . . . .	27
4	Illustration de l'hormesis . . . . .	28
5	Sites d'échantillonnages choisis et sources potentielles de pollution : le point vert est le site de référence, le point rouge est le site de référence de l'étude de Jonas Margot, le point violet est le site d'échantillonnage à l'aval du déversoir d'orage et des eaux de ruissellement de l'autoroute (tout deux représentés par un triangle jaune) . . . . .	30
6	Lieu d'échantillonnage du site de référence . . . . .	32
7	Lieux d'échantillonnage pour le site à l'aval de déversoir de Bad et de l'autoroute . . . . .	32
8	Débit de l'Urtenen et précipitations à Mattstetten durant les deux mois précédents l'échantillonnage . . . . .	33
9	Comparaison des mesures de métaux faites en 2007, durant l'étude de Jonas Margot(02.04.2008) et durant la présente étude (28.10.2009) . . .	39
10	Comparaison des mesures de métaux faite par ICP-OES et Fluorescence X	40
11	Comparaison des empreintes HAPs entre la présente étude et celle de Jonas Margot . . . . .	42
12	Comparaison des concentrations de HAPs entre la présente étude et celle de Jonas Margot . . . . .	43
13	Comparaison des empreintes PCBs entre la présente étude et celle de Jonas Margot . . . . .	46
14	Plan des sites d'échantillonnages pour la détermination des indices bio- logiques . . . . .	47
15	Tronçons U1 et U3 . . . . .	48
16	Site U3 le 2.10.2001 avant renaturation . . . . .	49
17	Qualité des eaux de l'Urtenen en 1960 et 2008[2] . . . . .	50
18	Résultats des bioessais conduit avec les eaux de porosité et exprimés en unité toxique . . . . .	59
19	Résultats des bioessais conduit avec les extraits organiques et exprimés en unité toxique . . . . .	60
20	Arbre de décision pour l'analyse du risque lié aux métaux dans les sé- diments dans la législation australienne . . . . .	68

## Liste des tableaux

1	Tableau de contingence pour interpréter les résultats des analyses des polluants et de l'indice biologique . . . . .	17
2	Tableau de contingence pour interpréter la TRIAD . . . . .	18
3	Tableau de détermination de l'IGBN . . . . .	24
4	Tableau d'interprétation des indices SED-TOX . . . . .	29
5	Mesures aux stations d'échantillonnage . . . . .	34
6	observations sur les sédiments prélevés . . . . .	34
7	Teneur en eau et distribution granulométrique des sédiments . . . . .	34
8	Données pour le calcul de la représentativité du volume . . . . .	35
9	Concentrations de soufre élémentaire analysées . . . . .	35
10	Mesures d'ammonium dans l'eau interstitielle . . . . .	36
11	Résultats des analyses des métaux lourds dans les sédiments . . . . .	37
12	Classification de la qualité des sédiments par les métaux d'après la CIPR . . . . .	38
13	Mesures des métaux lourds et valeurs de l'étude de l'OFEV . . . . .	39
14	Résultats des analyses des HAPs dans les sédiments . . . . .	41
15	Ratios pour l'identification de l'origine des HAPs . . . . .	44
16	Résultats des analyses des PCBs dans les sédiments . . . . .	45
17	IBGN calculés pour les sites canalisés en renaturés en 2003 près du village de Holzmühle . . . . .	49
18	Mesures des paramètres physico-chimiques des échantillons . . . . .	51
19	Résultats du test Microtox® sur l'échantillon témoin du DMSO . . . . .	52
20	Résultats des tests Microtox® sur les extraits organiques après 15 minutes . . . . .	52
21	Résultats des tests Microtox® sur les extraits organiques après 30 minutes . . . . .	53
22	Résultats des bioessais sur <i>Daphnia magna</i> . . . . .	54
23	Résultats des bioessais sur <i>Brachionus calyciflorus</i> . . . . .	55
24	Résultats des bioessais sur <i>Ceriodaphnia dubia</i> . . . . .	57
25	Résultats du test des extraits organiques sur les algues vertes . . . . .	57
26	Résultats du test des eaux de porosité sur les <i>Lemna minor</i> . . . . .	58
27	Comparaison des résultats des bioessais avec ceux de Jonas Margot pour le site 1 . . . . .	61
28	Comparaison des résultats des bioessais avec ceux de Jonas Margot pour le site 2 . . . . .	61
29	Comparaison des indices SED-TOX . . . . .	63
30	Comparaison de solvant utilisés pour l'extraction de polluants organiques pour des bioessais . . . . .	73
31	Relation entre la température et le temps en fonction de la profondeur de prélèvement . . . . .	84
32	Mesures des paramètres physico-chimiques des échantillons à la fin du premier test avec <i>Daphnia magna</i> . . . . .	91
33	Mesures des paramètres physico-chimiques des échantillons à la fin des tests sur extraits organiques avec <i>Daphnia magna</i> . . . . .	91
34	Résultats du test Microtox® sur les standards toxiques à 15 minutes . . . . .	92

# 1 Introduction

## 1.1 Question du rejet des eaux pluviales et Directive STORM

Dans les réseaux d'évacuations mixtes, les eaux usées et claires sont mélangées. Les stations d'épurations doivent alors être munies d'un déversoir d'orage à leur entrée. En cas d'épisode pluvieux important, il permet de dévier le débit excédentaire (vers l'environnement naturel ou des bassins de rétentions) pour éviter un lessivage des boues activées. Les eaux des déversoirs d'orages sont donc un mélange d'eaux usées chargées en matière organiques, azote ammoniacale et débris (par exemple papier de toilette) et d'eaux de ruissellement (eaux claires) pouvant être chargées en particules fines et polluants divers (HAPs ou PCBs[48]). Pour ces raisons, les déversoirs d'orages présentent un potentiel de contamination de l'environnement et sont d'ailleurs définis dans l'Ordonnance sur la protection des eaux (OEaux)<sup>1</sup> *Annexe 3.1* comme *eaux polluées* nécessitant un intérêt particulier *selon l'état de la technique et du milieu récepteur*.

De plus, pour protéger les eaux de surfaces et les cours d'eaux suisses, il y a l'obligation pour les municipalités d'établir un plan d'évacuation des eaux usées et des eaux claires provenant des zones habitées (PGEE : plan général d'évacuation des eaux), dont les objectifs et les moyens sont définis par l'article 5 de l'OEaux.

Pour adapter les directives suisses à l'état actuel de la technique sur l'impact des déversoirs d'orage sur les milieux récepteurs, une commission a été constituée par l'OFEV. Elle a produit un ensemble de recommandations sur les différents paramètres produisant un impact sur l'écosystème riverains<sup>2</sup> : risque de colmatation par les matières en suspension, toxicité liée à l'ammonium ou aux sédiments, augmentation de la température, eutrophication. Cette commission a aussi produit un logiciel, REBEKA, qui permet à partir de données recueillies sur le terrain de prédire quels sont les paramètres à risque pour la situation données.

En cas de risque prédit par REBEKA pour les sédiments, la question est de pouvoir confirmer si le risque est réel et s'il n'est pas une erreur de type 1 (une réponse positive est donnée alors qu'il n'y a pas de risque). Plus loin, se pose de l'évaluation de la qualité des sédiments dans le droit suisse.

## 1.2 Législation suisse liée aux sédiments

A l'*Annexe 1.3.b* de l'Oeaux, il est dit que la qualité de l'eau doit être telle que [...] *les sédiments ne contiennent pas de substance de synthèse persistantes, et à l'alinéa c, que les substances pouvant entraver les processus biologiques qui permettent aux végétaux et aux animaux de couvrir leurs besoins physiologiques fondamentaux ne s'accumulent pas dans les sédiments*.

La loi suisse possède donc la notion de protection des sédiments orientée à la fois sur la présence de substances de synthèse persistantes (mais sans toutefois fixer des valeurs limites) et sur l'effet des substances sur les espèces du milieu naturel. Mais elle n'est pas encore dotée de directives techniques permettant d'évaluer le risque causé par ces substances sur l'écosystème récepteur.

1. <http://www.admin.ch/ch/f/rs/8/814.201.fr.pdf>

2. <http://www.vsa.ch/Plan-general-d-evacuation-des.118.0.html?&L=fr>

### 1.3 Chimie des polluants dans les sédiments

Le compartiment benthique est une zone importante de l'écosystème riverain. En effet, il est l'habitat de nombreuses espèces : mollusques, crustacés, invertébrés, insectes... Certaines espèces n'y vivent qu'une étape de leur cycle de vie, par exemple l'état larvaire des insectes éphéméroptères et des trichoptères<sup>3</sup>. Il y a aussi des échanges de matières avec les espèces pélagiques par la chaîne trophique.

La principale voie de contamination des sédiments est le stockage des polluants dans les sédiments fins et organiques. De cette manière, la concentration de polluant devient plus importante dans les sédiments que dans la colonne d'eau. Ainsi, si une étude de risque est basée uniquement sur l'eau du cours d'eau, elle ne pourra pas prédire la contamination des sédiments.

Il y a d'autres voies de transfert et de dégradation des polluants dans l'étage benthique (voir figure 1). Par exemple, des microorganismes peuvent dégrader des hydrocarbures aromatiques polycycliques[1] ou des pesticides[12].

Les interactions entre les polluants organiques et le carbone organique sont complexes et ne sont pas encore pleinement élucidés. La théorie la plus simple, celle de la partition à l'équilibre est basée sur un seul paramètre d'équilibre  $K_{oc}$ [16][18] dépendant uniquement de la substance. Plus loin, il a été observé que les différents types de carbones, carbone organiques, carbone noir[43] ou l'âge de la matière organique[31] jouaient aussi un rôle important dans leurs interactions avec les polluants.

Un autre paramètre important est la morphologie et l'hydrologie de la rivière. Ainsi, ce sont les phénomènes d'érosions et d'accumulation transportent les sédiments fins et qui influencent donc la création de sites "puits" de toxicité. La variation saisonnière de l'hydrologique cause donc une variation de la toxicité des sites[29][54].

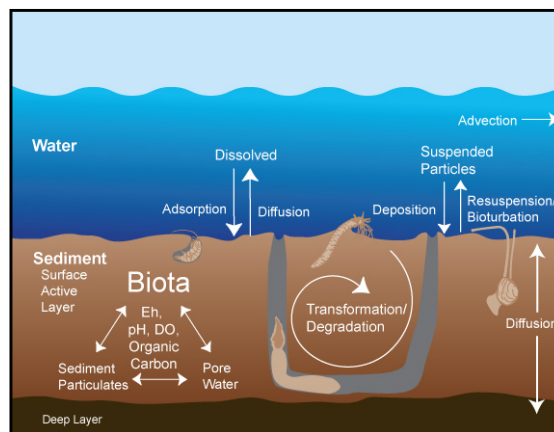


FIGURE 1: Les mécanismes qui modifient la forme et la distribution des polluants :  
source de l'image : <http://www.sccwrp.org/view.php?id=291>

### 1.4 But du présent rapport

Ce rapport a pour objectif de proposer et discuter une méthode, relativement ambitieuse dans les moyens requis et dans la précision du diagnostique, pouvant servir

3. <http://www.invfmr.fr/invfmr/>

de base de réflexion à l'autorité compétente pour établir une directive technique pour l'évaluation de la pollution et de la toxicité de sédiments. Certains choix ont été fait ici, notamment sur l'appréciation du risque qui relèvent uniquement de l'interprétation du chercheur : en pratique ces choix doivent être fait par l'autorité légiférante sur les conseils des scientifiques.

La première partie décrit donc cette méthode basée sur l'approche par faisceau de preuve. Cette méthode étudie la question des sédiments depuis plusieurs points de vue pour fournir une réponse intégrant la complexité de ce compartiment environnemental. Les avantages et limites des choix faits y seront discutés, mais les alternatives ne seront introduites que dans la troisième partie.

Dans un deuxième temps, la méthode est mise en application pour un site particulier : celui du déversoir d'orage en aval du lac Moossee sur la rivière Urtenen, dans le canton de Berne.

Dans la dernière partie, les alternatives aux différents choix faits pour l'élaboration de cette méthode sont discutées ainsi que les perspectives pour l'amélioration et la standardisation de la méthode proposée.

## **2 Proposition d'une méthode d'évaluation basée sur l'approche par faisceau de preuves**

Le développement de cette approche vient de la constatation faite que, dans l'état actuel de la technique, la toxicité liée à la pollution des sédiments nécessite une approche multipliant les points de vues pour approcher de la complexité des comportement chimiques liant l'environnement abiotique, les différents polluants et les organismes du milieu récepteur.

### **2.1 Principe**

L'objectif de cette approche est de confirmer la présence de pollution et son lien avec une dégradation de l'environnement. Mais le compartiment sédiment est très complexe : l'ensemble des réactions chimiques entre les solutés de la colonne d'eau, le sédiment et la biocénose n'est pas complètement élucidé dans l'état actuel de la connaissance. Notre approche consiste à étudier la question de la pollution et de son effet toxique sur l'écosystème benthique depuis différents points de vues puis à interpréter les différents résultats à travers des tableaux de contingence pour définir le risque toxique. Ainsi, c'est la somme des preuves qui permet de répondre à la question centrale. C'est pourquoi cette méthode est appelée approche "weight-of-evidence" en anglais et que l'on pourrait traduire en français par approche "par faisceau de preuves".

Pour le choix des différentes voies d'investigations (en anglais Lines of Evidence), de nombreux auteurs (dont Chapman et al.[11]) sont d'accord pour définir la TRIAD composée des analyses physico-chimiques, des tests écotoxicologiques et de l'indices biologique de la macrofaune benthique, comme une base satisfaisante pour fournir une réponse critique. D'autres voies d'investigations existent pour affiner les réponses ou élargir un point de vue : par exemple, l'approche AVS-SEM (Acide Volatil sulfide - Simultaneously Extracted Metal en anglais)[16][18] permet de mieux comprendre la bio-



disponibilité des métaux lourds divalents par l'analyse des sulfures réduits qui forment des complexes insolubles et donc non biodisponibles. Un autre exemple est l'étude de la bioaccumulation des polluants organiques à travers l'analyse des tissus d'espèces benthiques[40][41] pour élucider les voies de contamination et d'amplifications de certains polluants persistant à travers la chaîne trophique.

Il est important de rappeler le but de ce rapport pour comprendre l'intérêt de la démarche proposée. Le but de cette méthodologie est de valider le risque toxique lié au compartiment sédiment à l'aval de déversoir d'orage simulé par le logiciel REBEKA et si possible même de classer le risque observé. L'objectif n'est donc pas de faire une étude complète de l'étage sédimentaire à chaque situation en utilisant l'ensemble des voies d'investigations disponibles et applicables. En effet, le coût d'un tel investissement ne peut pas toujours se justifier.

La première étape est donc de définir le degré d'importance du site et la précision des résultats nécessaires à la protection des enjeux présents. Cette étape doit se faire en même temps que l'étude et la récolte de données utilisées pour le fonctionnement du logiciel REBEKA.

Ensuite certaines conditions sont essentielles à la bonne pratique de cette méthode. Il est essentiel de maîtriser les méthodes de mesures et connaître les incertitudes liées à chaque voie d'investigation.

Il faut pouvoir comparer chaque mesure avec celle d'un site de référence considéré comme non-toxique. En général, on utilisera un site en aval du déversoir d'orage mais il est aussi possible d'utiliser un point de référence régional.

Pour pouvoir adapter la réponse aux enjeux environnementaux, économiques et sociaux liées au site, il est donc intéressant de proposer une méthode étagée avec des "résultats cibles" permettant de progresser dans l'arborescence. En standardisant cette démarche, on peut ainsi mieux maîtriser le coût des études.

## 2.2 Approche par étape

La description de la méthode par étape est présentée dans cette section (voir figure 2) en présentant l'importance et les limites de chaque voie d'investigation. La description de chacune de ces voies sera décrite plus en détail dans les sections suivantes.

**Etude préliminaire** Le rôle de l'étude préliminaire est de permettre de faire un échantillonnage pertinent et de pouvoir interpréter les résultats des différentes voies d'investigations. Les données nécessaires sont principalement recueillies dans l'étude nécessaire à l'application du logiciel REBEKA pour l'étude de l'influence du déversoir d'orage sur la rivière. Finalement, l'étude préliminaire doit permettre de :

1. Définir les enjeux du site (écologiques, économiques...), et le degré de protection requis.
2. Identifier les sources potentielles de pollution (et les polluants associés).
3. Identifier les facteurs principaux influençant la toxicité des polluants.

**Echantillonnage** L'échantillonnage est le préambule essentiel à toute analyse car c'est à ce moment que l'on réduit notre système d'étude. En effet, l'environnement est

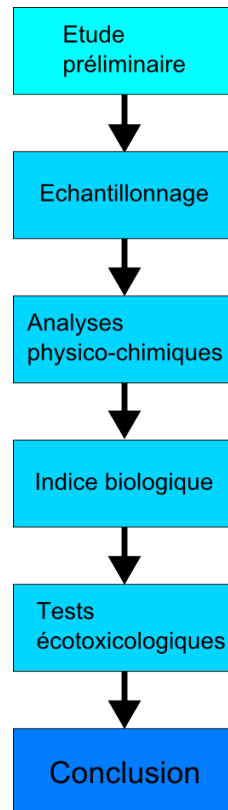


FIGURE 2: Schéma de l'approche par étape proposée

un système extrêmement vaste et complexe. Et l'échantillonnage consiste à mener une simplification qui nous permettra, en fonction de nos moyens et de l'état de la technique, de répondre à notre question d'intérêt.

Mais chaque hypothèse qui mène à une nouvelle réduction du système amène aussi une incertitude, imprécision sur le résultat final. Maîtriser l'étape de l'échantillonnage permet donc d'évaluer plus justement l'erreur de l'analyse et de pouvoir interpréter les résultats avec plus de pertinence.

**Analyses physico-chimiques** Les analyses physico-chimiques des sédiments ont plusieurs intérêts :

1. Vérifier l'abondance des polluants les plus problématiques dans le cas de déversoirs d'orages et ceux dont on a fait l'hypothèse de la présence dans l'étude préliminaire.
2. Prédire le risque des polluants de manière individuelle et par classe en utilisant des "recommandations sur la qualité des sédiment".

Les limites de cette voie d'investigations sont :

1. La prédiction du risque pour des mélanges de classes différentes n'est pas prise en compte dans l'état actuel de la technique.
2. Les recommandations portent seulement sur une probabilité d'effet toxique sur les organismes benthiques et nécessitent donc une confirmation.

3. Elles ont été déterminé pour des caractéristiques de site particulières et ne sont pas adaptées aux conditions physico-chimiques de chaque site.

L'utilisation seule de cette voie d'investigation permet de conclure :

- Si le résultat est positif :
  1. Quels polluants sont présents et en quelle abondance.
  2. Quels risques y sont associés.
  3. Mais pas si le risque est réel.
  4. Pas non plus, si d'autres polluants non mesurés présentent aussi un risque.
- Si le résultat est négatif :
  1. Qu'aucun des polluants soupçonnés n'est présent en quantité toxique significative.
  2. Mais pas si d'autres substances sont en abondance potentiellement toxiques.
- Dans les deux cas donc il peut être intéressant de prolonger l'approche avec d'autres tests pour confirmer le risque et affiner la réponse des analyses physico-chimiques. Pour cela, l'indice biologique basé sur les communautés de macroinvertébrés benthiques offre une solution simple et complémentaire.

**Indice biologique** L'indice biologique offre des réponses qui ne peuvent pas être obtenues par la simple analyses des sédiments. Il utilise l'étude des structures des communautés de macroinvertébré benthiques comme indicateur de l'état de la biocénose benthique. Puis, par comparaison avec un site de référence (aval du déversoir et/ou référent régional), décrit l'état de la dégradation. Aussi, la richesse des espèces est prise en compte ainsi que la sensibilité de certains taxons par rapport à d'autres plus résistants.

Comme il ne donne pas d'indication sur les causes de la dégradation, et est très dépendant des condition du lieux d'échantillonnage (la notion d'habitat est approfondies plus loin), il est complémentaire avec les analyses physico-chimiques menées précédement.

Les limites de cet indice sont que :

1. La qualité de l'habitat échantillonné et l'ensemble des conditions physico-chimiques joue un grand rôle dans l'assemblage des communautés présentes. Il est donc primordial (bien que difficile en pratiques) de trouver des sites d'échantillonnage très semblables pour pouvoir les comparer.
2. L'ensemble de la biocénose benthique n'est pas représenté par cet indice.
3. Plusieurs années d'études sont nécessaires pour pouvoir comparer deux sites et s'extraire des conditions de stress passagers qui ne sont pas forcément décelable au moment de l'échantillonnage et des variations saisonnières.

L'interprétation des résultats des deux premières voies d'investigations est aidée par l'utilisation du tableau de contingence 1.

**Tests écotoxicologiques** Pour renforcer l'indice biologique, la dernière voie d'investigation de l'approche TRIAD est constitué des tests écotoxicologiques sur des organismes de référence. Les avantages de cette technique sont :

1. Permet de confirmer les présomptions de toxicité des analyses sur d'autres espèces que celle utilisés pour l'indice biologique aux sensibilités différentes.
2. Tient compte des mélanges de polluants au contraire des recommandations sur la qualité des sédiments.
3. En utilisant différents organismes aquatiques, permet de donner un aperçu de l'influence de la pollution sur plus d'éléments de la chaîne trophique.

Les limites de cette voie d'investigation sont :

1. Difficulté de l'interprétation des résultats des différents extraits (surtout extrait organique dans l'état actuel de la technique).
2. Moins représentatif de l'écosystème que l'indice biologique.
3. Elle est peu appliquée en Suisse : par exemple les bioessais sur les macroinvertébrés qui sont les bioessais les plus représentatifs de l'environnement car ils peuvent se faire sur des échantillons de sédiment entier.

Pour aider l'interprétation des trois voies d'investigations, on peut utiliser le tableau de contingence 2. Les deux tableaux de contingences utilisés sont décrit dans le guide de l'USEPA[34], ils ont donc été traduits et adaptés.

L'ordre choisi pour effectuer ces trois voies d'investigations est discutable mais il répond à la fois à la nécessité de comprendre ce que chacune apporte aux autres et au besoin de les ordonner pour pouvoir faire des études plus légères (un simple screening par exemple pour corriger rapidement les réponses positives fausses du logiciel REBEKA).

	analyses chimiques	Indice Biologique	Conclusions Possibles
1	+	+	<i>Impact probable</i> : les deux tests indiquent une contamination
2	-	-	<i>Impact improbable</i> : la contamination n'est pas observée avec évidence
3	+	-	<i>Impact possible</i> : il y a pollution mais les communautés de macroinvertébrés benthiques n'y sont pas sensibles
4	-	+	<i>Impact possible</i> : il y a une dégradation des communautés de macroinvertébrés benthiques mais la cause est inconnue
+ = test indiquant un impact négatif par comparaison avec un site de référence			
- = test n'indiquant pas d'impact négatif par comparaison avec un site de référence			

TABLE 1: Tableau de contingence pour interpréter les résultats des analyses des polluants et de l'indice biologique

	analyses chimiques	bioessais	Indice Biologique	Conclusions Possibles
1	+	+	+	<i>Impact très probable</i> : tous les tests convergent pour indiquer la dégradation de la biocénose benthique par les polluants mesurés
2	-	-	-	<i>Impact très improbable</i> : aucune évidence de l'exposition
3	+	-	-	<i>Impact peu probable</i> : les polluants ne sont pas disponibles pour les organismes benthiques
4	-	+	-	<i>Impact possible</i> : une toxicité est observée mais les contaminants ne sont pas mesurés ou d'autres facteurs physico-chimiques sont néfastes
5	-	-	+	<i>Impact peu probable</i> : pas de lien évident entre une pollution et la dégradation des communautés benthiques qui sont probablement influencées par des facteurs physiques
6	+	+	-	<i>Impact probable</i> : les substances chimiques provoquent probablement un stress sur la biocénose benthique
7	-	+	+	<i>Impact probable</i> : des polluants non mesurés contribuent probablement à la toxicité observée
8	+	-	+	<i>Impact probable</i> : les polluants mesurés dégradent la faune benthique mais les organismes d'essais sont probablement peu sensibles à ces polluants

+ = test indiquant un impact négatif par comparaison avec un site de référence

- = test n'indiquant pas d'impact négatif par comparaison avec un site de référence

TABLE 2: Tableau de contingence pour interpréter les résultats des voies d'investigations de la TRIAD

## 2.3 Echantillonnage

L'échantillonnage est une des premières étapes pratique. Maîtriser cette étape est donc essentielle pour pouvoir conduire des analyses sensées et pour pouvoir interpréter les résultats de manière pertinente.

### 2.3.1 Représentativité temporelle

En tant que source de sédiments fins et d'eaux potentiellement polluées, les déversoirs d'orage peuvent amener ponctuellement des polluants dans les rivières et le compartiment sédiment[48]. Ce phénomène est donc directement lié aux évènements pluvieux qui en tant qu'évènements imprévisibles peuvent être décrits de façon stochastique. D'autre part, la dynamique des sédiments est décrite principalement par le coefficient de friction qui correspond à la vitesse critique à partir de laquelle les sédiments du fond du lit d'une certaine taille sont mis en mouvement[39]. Mais le but de cette méthode n'est pas de décrire complètement la dynamique des sédiments contaminés. Ainsi, l'échantillonnage doit se faire de manière ponctuelle dans le temps, idéalement plusieurs fois dans l'année pour tenir compte des multiples variations saisonnières (tant des activités humaines que du climat ou de l'activité des écosystèmes)[29][54]. Le moment idéal pour échantillonner est après un évènement pluvieux suffisamment important pour emporter et déposer des sédiments frais à notre site d'intérêt. On doit donc lier cet échantillon avec l'évènement pluvieux précédecédent. Si l'on considère que la quantité et la contamination des sédiments dépendent de l'importance de la pluie, alors peut essayer de lier cette contamination avec la fréquence d'apparition de la pluie ou le débit de la rivière.

### 2.3.2 Représentativité spatiale

Le compartiment sédimentaire dans une rivière est fortement hétérogène, à la fois horizontalement et verticalement.

La répartition horizontale est liée aux phénomènes d'érosions et d'accumulations, à la dynamique et morphologie du cours d'eau, et amène des différences même à de faibles distances[21]. Pour simplifier, les régions de faibles énergies seront des zones de dépôt de sédiments fins alors que les zones d'énergies fortes seront des zones de décrochement de matière. La multiplicité des conditions dans le fond du lit crée ainsi un nombre important d'habitats différents pour les organismes benthiques.

La structure verticale est aussi liée à la dynamique des sédiments du cours d'eau. De plus, les phénomènes de transfert verticaux (p.e. d'oxygènes, de matière organique ou de polluants) jouent un rôle important[19][23]. Principalement, la partie supérieure est oxygène et la partie inférieure est anoxique. De fait, la présence de bactérie sulforéductrices entraîne une accumulation de soufre réduit jouant un rôle important pour la biodisponibilité des métaux.

### 2.3.3 Choix de la station

L'échantillonnage doit se faire de manière dirigée dans une zone d'accumulation où il y a présence de sédiments frais pour palier la dégradation de certains polluants et fins au

fort potentiel de stockage toxique. En aval d'un déversoir d'orage, cette zone doit être déterminée sur le terrain dans une zone d'énergie faible par un spécialiste.

### 2.3.4 Volume représentatif d'échantillon

Le volume représentatif est basé sur l'idée d'hétérogénéité selon Pierre Gy[27]. Il propose une formule qui permet de calculer la précision de l'échantillonnage en fonction de l'hétérogénéité des sédiments, des concentrations de polluants attendus et du volume prélevé. Le facteur d'hétérogénéité  $IH_L$  se calcule à partir des facteurs granulométriques (du facteur de libération  $\beta$ , du facteur de forme  $f$  et de la distribution granulométrique  $g$ ), de la taille des particules  $d$  et du facteur  $c$  dérivé à partir de la quantité de substance par unité volumique (voir équation 1).

$$IH_L = c \cdot \beta \cdot f \cdot g \cdot d^3 \quad (1)$$

Ensuite, le volume de l'échantillon  $M_{EO}$  est lié à la variance de l'erreur  $S_0^2$  par le facteur d'hétérogénéité  $IH_L$ .

$$M_{EO} = \frac{IH_L}{S_0^2} \quad (2)$$

Si le volume d'échantillonnage est fixé par le matériel disponible (caroteur, benne), alors on peut calculer l'erreur d'échantillonnage qui lui correspond.

## 2.4 Analyses physico-chimiques

Cette première partie de l'approche par faisceau de preuves est basée sur l'analyse des concentrations de polluants et des caractéristiques physico-chimiques des sédiments qui, interprétées à l'aide de "Recommandations sur la Qualité des Sédiments" (abrége par RQS en français et traduit en anglais par Sediment quality guidelines, et abrége par SQG) permettent de caractériser le risque toxique des sédiments pour l'écosystème benthique et épibenthique.

### 2.4.1 Choix des polluants à analyser et des méthodes analytiques

Le choix des polluants à analyser dans les sédiments doit se faire sur la base de l'étude préliminaire pour déterminer quels sont les polluants potentiellement présents dans des concentrations toxiques. Les méthodes analytiques utilisées doivent être standardisées et appliquées par un personnel compétant, et pratiquant de réguliers contrôles inter-laboratoires. Les protocoles utilisés ici pour la préparations des échantillons pour les analyses sont décrites : pour l'analyse des métaux lourds (par ICP-OES à l'annexe 6.4 et par fluorescence X à l'annexe 6.5), pour les hydrocarbures polycycliques aromatiques (HAP) et les polychloro-biphényles (PCB) à l'annexe 6.6, pour l'ammonium à l'annexe 6.7, et pour le soufre élémentaire à l'annexe 6.9.



### 2.4.2 Introduction aux recommandations sur la qualité des sédiments

L'objectif des recommandations sur la qualité des sédiments est de donner des valeurs pour des polluants individuels ou des classes de polluant en mélange assurant une protection de l'écosystème benthique pour un temps d'exposition illimité.

*"Idéalement, les RQS devraient être élaborées à partir de données dose-réponse détaillées qui décrivent la toxicité aiguë et chronique de produits chimiques individuels dans les sédiments pour des stades de vie sensibles d'espèces sensibles d'organismes aquatiques. Ces données devraient être obtenues à partir d'études de laboratoire contrôlées permettant de reconnaître et de quantifier les effets de variables environnementales importantes qui influent sur la toxicité. Par la suite, les résultats de ces études devraient être validés par des essais sur le terrain pour s'assurer que toutes les RQS élaborées à partir de ces données sont applicables dans une grande variété de lieux [...]. Une connaissance poussée des facteurs qui influent sur la toxicité viendrait également étayer les évaluations de la qualité des sédiments propre à un site particulier en fournissant une base à partir de laquelle on peut évaluer l'applicabilité des recommandations dans les conditions propres à un site particulier (p. ex., carbone organique total [COT], granulométrie, sulfures volatils en milieu acide)", cité du Protocole pour l'élaboration de recommandations pour la qualité des sédiments en vue de la protection de la vie aquatique[51].*

Malheureusement l'état actuel de la technique ne fournit pas des RQS aussi complètes pour tous les polluants et les mélanges. Il existe différentes méthodes pour dériver ces RQS : la méthode empirique, la méthode mécaniste et la méthode de type consensus. La méthode empirique lie des mesures de toxicité sur bioessais (en laboratoire ou *in situ* avec des concentrations de polluants individuels et/ou des classes de polluants (en mélange). Les bioessais s'intéressent à la fois aux toxicités aiguës et chroniques sur des espèces benthiques, épibenthiques et pélagiques. La méthode mécaniste part de l'hypothèse de partition des polluants (principalement organique non-polaires mais aussi métaux) entre une phase en solution et une phase attachée au sédiment. Cette hypothèse de partition pose une relation simple entre les deux à travers un coefficient de partition  $K_{oc}$ . Ainsi, la toxicité de la colonne d'eau associée à une concentration connue de polluant permet de connaître de manière univoque la toxicité du sédiment. De nombreuses études ont montrés que le résultat de ces deux approches est proche[58]. Enfin, la méthode dite par consensus aggrège les résultats de ces deux méthodes pour obtenir une valeur de recommandation tenant ainsi compte de plus de paramètres environnementaux. Ce n'est donc pas un consensus au sens de décision prise par accord commun entre des scientifiques.

### 2.4.3 Choix d'un système de recommandations

Dans cette étude nous avons choisi d'utiliser les valeurs de TEC (Threshold Effect Concentration en anglais), et de PEC (Probable Effect Concentration en anglais), développées par MacDonald et al.[35] et calculées avec une méthode de type consensus. La TEC est définie comme la valeur limite sous laquelle un effet toxique n'est pas attendu sur la faune benthique et la PEC est définie comme la concentration en dessus de laquelle un effet néfaste sur l'écosystème benthique est fréquemment observable.

Ils ont dérivés ces deux valeurs limites pour différentes classes de polluants : les métaux lourds (huit différents), les polychloro-biphényles (PCB), les hydrocarbures polycycliques aromatiques (HAP)(treize différents) et quelques pesticides organochlorés (neuf différents) faisant partie de la liste des polluants organiques persistants prioritaires et interdit par la convention de Stockholm de 2001. Pour dériver ces valeurs, ils ont agrégés les résultats obtenues par d'autres auteurs ayant eux même élaborer des recommandations sous d'autres formes (ERL-ERM[33], TEL-PEL[36]...) et les résultats utilisés proviennent d'études aiguë et chroniques conduites sur plusieurs espèces incluant les espèces benthiques *Hyaella azteca*, *Hexagenia limbata*, *Chironomus tentans*, *Chironomus riparius*, *Lumbriculus variegatus*, mais aussi pélagiques *Ceriodaphnia dubia* et *Vibrio fischeri*. Finalement Macdonald et al. ont normalisé les résultats pour des sédiments contenant 1% de carbone organique.

Les limites de ce système de recommandation est aussi celui tous les RQS et sont liés à la manière dont ils sont implémentés. Ainsi, comme les données *in situ* utilisés proviennent en générale d'une même région, il n'est pas forcément juste de les utiliser ailleurs. Aussi ne sont pas prise en compte dans les recommandations : les propriétés des sédiments (telles que la granulométrie, la teneur en carbone organique, en composé sulfurés réduits), les effets des mélanges entre des polluants de différentes classes ou les différents types d'action toxique (narcotique, tératogène, mutagène). En principe, l'hypothèse d'additivité des toxicités est appliquée et les interactions de type synergiques par exemple sont aussi ignorés[58].

## 2.5 Indice biologique

Dans l'objectif de protection de la biodiversité et des écosystèmes, la détermination d'un indice biologique pour la faune benthique, principalement à travers l'étude des communautés de macroinvertébrés permet une comparaison directe entre les sites et offre un outil précieux pour l'application du principe de protection et de prévention des atteintes sur les écosystèmes riverains.

L'étude de cette macrofaune tient compte en effet de l'ensemble des conditions du milieu et intègre les variations de l'état du cours d'eau durant la période de vie des organismes. Comme il n'est pas possible d'étudier l'ensemble de l'écosystème benthique, les communautés de macroinvertébrés jouent le rôle d'indicateur.

L'indice biologique utilisé, l'IBGN (indice biologique global normalisé) fait partie du système modulaire gradué utilisé dans la loi suisse pour l'évaluation globale des cours d'eaux à travers l'étude de différents modules (hydrologique, morphologique, biologique, écologique, écotoxicologique).

Comme cet indice répond à des exigences définies dans la loi suisse et est amené à être appliqué par des organes différents dans chaque canton, il possède une méthode standardisée (pour l'échantillonnage, la conservation, l'observation et le calcul des indices). Les principes cités dans cette section sont ceux décrits dans la directive technique : Méthodes d'analyse et d'appréciation des cours d'eau : Macrozoobenthos Niveau R[22], édité par l'OFEV en 2005.

### 2.5.1 Echantillonnage

L'échantillonnage dans le cadre de l'indice répond aux mêmes exigences que pour l'échantillonnage pour l'analyse des polluants et les extractions pour les bioessais tels que décrit dans la section 2.3. Il y a toutefois des spécificités à préciser ici.

Une question déjà abordée est celle de l'hétérogénéité spatiale dans le compartiment benthique. Pour des communautés vivantes, l'on parle d'habitat pour exprimer l'ensemble des conditions propres à favoriser certaines espèces particulières. Ainsi, si l'on compare les résultats provenant de différents habitats proches sur un même tronçon, les différences mesurées par l'analyse de la diversité des macroinvertébrés peut être uniquement causée par les variations des conditions du milieu tel que la profondeur d'eau, la taille des sédiments du fond, la présence de macrophytes ou de matière en suspension... Il est donc important lors du choix des stations de trouver des habitats très semblables pour favoriser la pertinence de la comparaison des résultats. La question de la ressemblance entre les stations a aussi été abordée pour les autres mesures, principalement à propos des caractéristiques physico-chimiques tels que la teneur en matière organique ou la teneur en sédiment fin mais elle revêt une plus grande importance ici.

Une autre spécificité est due aux cycles de croissance et de vie des macroinvertébrés. Pour cela, il est conseillé d'effectuer deux campagnes d'échantillonnage durant l'année : une entre février et avril et une autre entre juin en août/septembre et sur plusieurs années. Il est aussi recommandée de respecter un délai de 15 à 30 jours après une crue entraînant un charriage de fond ou une période d'étiage sévère pour retrouver des conditions stables.

### 2.5.2 Calcul de l'Indice Biologique Globale Normalisé

Il existe plusieurs indices basés sur le nombre d'espèces de macroinvertébré benthique mesurés et sur leurs nombres d'individus. L'indice IBGN (l'Indice Biologique Globale Normalisé) attribue une note entre 0 et 20 basée sur la présence de 138 taxons différents parmi les invertébrés benthiques. L'IBGN est déterminé à l'aide du tableau 3 comprenant les quatorze classes de variétés taxonomiques et les neuf groupes faunistiques indicateurs (GI). La valeur de l'IBGN est obtenue en déterminant successivement :

- La variété taxonomique de l'échantillon (VT) égale au nombre total de taxons récoltés même s'ils ne sont représentés que par un seul individu. Ce nombre permet de déterminer la classe de variété taxonomique.
- Le groupe faunistique indicateur (GI) en ne prenant en compte que les taxons indicateurs présents dans les échantillons. La détermination du GI s'effectue en prospectant la première colonne du tableau de haut en bas (de GI 9 à GI 1). La première présence significative ( $n > 3$  individus ou  $n > 10$  individus) d'un taxon indicateur du répertoire détermine le GI de l'échantillon.

## 2.6 Tests écotoxicologiques

Le principe des tests écotoxicologiques repose sur la mise en contact d'échantillons environnementaux avec des organismes des tests dans des conditions standardisées ou connues et de mesurer l'évolution d'une variable de ces organismes (la survie, la crois-

Classe de variété		14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1
Taxon	St		45	41	37	33	29	25	21	17	13	10	7	4	1
		>50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	GI		49	44	40	36	32	28	24	20	16	12	9	6	3
<i>Chloroperlidae</i>															
<i>Perlidae</i>	9	20	20	20	19	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9
<i>Perlodidae</i>															
<i>Taeniopterygidae</i>															
<i>Capniidae</i>															
<i>Brachycentridae</i>	8	20	20	19	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8
<i>Odontoceridae</i>															
<i>Philopotamidae</i>															
<i>Leucridae</i>															
<i>Glossosomatidae</i>															
<i>Beraeidae</i>	7	20	19	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7
<i>Goeridae</i>															
<i>Leptophlebiidae</i>															
<i>Nemouridae</i>															
<i>Lepidostomatidae</i>	6	19	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6
<i>Sericostomatidae</i>															
<i>Ephemeridae</i>															
<i>Hydroptilidae</i>															
<i>Heptageniidae</i>	5	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5
<i>Polymitarcidae</i>															
<i>Potamanthidae</i>															
<i>Leptoceridae</i>															
<i>Polycentropodidae</i>	4	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4
<i>Psychomyidae</i>															
<i>Rhyacophilidae</i>															
<i>Limnephilidae</i> (*)															
<i>Hydropsychidae</i>	3	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3
<i>Ephemerellidae</i> (*)															
<i>Aphelocheiridae</i>															
<i>Baetidae</i> (*)															
<i>Caenidae</i> (*)															
<i>Elmidae</i> (*)	2	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2
<i>Gammaridae</i> (*)															
<i>Mollusques</i>															
<i>Chironomidae</i> (*)															
<i>Asellidae</i> (*)	1	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1
<i>Achètes</i>															
<i>Oligochètes</i> (*)															

(\*) Taxons représentés par au moins 10 individus. Les autres par au moins 3 individus

TABLE 3: Tableau de détermination de l'IGBN

sance ou la reproduction). Dans le cas des tests sur des échantillons de sédiments, on peut utiliser différentes phases pour les bioessais : non seulement le sédiment entier mais aussi l'eau de porosité, des extraits aqueux ou organiques.

L'utilisation de bioessais permet d'observer l'effet toxique d'un sédiment sur plusieurs organismes de la chaîne trophique et permet ainsi de déterminer un risque pour l'écosystème. Aussi, ils permettent d'observer les interactions entre les polluants. Et en multipliant les points et les moments d'échantillonnage, on peut déterminer la distribution spatiale et temporelle de polluants. Des sources utiles pour l'utilisation des tests écotoxicologiques sont "le Guide pour l'utilisation des tests écotoxicologiques" rédigé par un groupe de travail de la Commission Internationale pour la protection des eaux du Léman (CIPEL)[49] ainsi que les rapports de la série de la protection de l'environnement (SPE) publiés par Environnement Canada et qui sont disponibles sur leur page internet<sup>4</sup>.

### 2.6.1 Choix des organismes de tests

Il existe une grande variété de bioessais standardisés utilisant des espèces aquatiques se situant le long de toute la chaîne trophique (des producteurs primaires avec les algues *Pseudokirchneriella subcapitata* ou les macrophytes *Lemna minor*, aux microcrustacés *daphnia magna*). Le choix des organismes d'essais doit se faire d'après les critères de faisabilité[49] des différents tests disponibles : la représentativité écologique, la rapidité du test, la facilité de lecture, l'applicabilité aux différents échantillons, le volume d'échantillon nécessaire, la complexité des manipulations, l'entretien (des élevages et des cultures), le prix...

Pour des bioessais sur des sédiments, les tests les plus représentatifs sont ceux pouvant se faire directement sur l'échantillon de sédiment entier comme les test sur les amphipodes ou les chironomes. Mais ces tests sont encore peu utilisés en Suisse et ne font donc pas partie de la batterie retenue.

Les tests finalement retenus pour la batterie de test sont le test Microtox® sur les bactéries luminescentes *Vibrio fischeri*[9], le test aiguë sur les microcrustacées *Daphnia magna*[8], le test chronique sur les microcrustacées *Ceriodaphnia dubia*[6], le test aiguë sur les rotifères *Brachionus calyciflorus*<sup>5</sup>, le test de croissance sur les algues *Pseudokirchneriella subcapitata*[7], le test de croissance sur les macrophytes *Lemna minor*[10].

Il est important d'avoir une batterie simple et standard pour pouvoir comparer les résultats avec différentes études. L'utilisation d'une batterie large offre l'avantage de proposer des sensibilités différentes à une même pollution et donne donc une réponse plus complexe qui ne néglige pas de compartiment de la biocénose aquatique. par contre, il faut noter qu'aucun des ces organismes n'est vraiment benthique même si au cours de leur vie, les daphnies par exemple peuvent se trouver dans l'étage épibenthique et être en contact avec des sédiments fins en suspension qu'elles ingèrent en filtrant l'eau[24].

4. [http://www.etc-cte.ec.gc.ca/organization/bmd/bmd\\_publist\\_f.html](http://www.etc-cte.ec.gc.ca/organization/bmd/bmd_publist_f.html)

5. [http://www.biohidrica.cl/pdfs/rotoxkit\\_m-protocol.pdf](http://www.biohidrica.cl/pdfs/rotoxkit_m-protocol.pdf)

### 2.6.2 Choix des phases et extraits d'essais

La phase la plus représentative pour conduire des tests écotoxicologiques est évidemment le sédiment entier. Mais comme la plupart des bioessais ont lieu sur des espèces pélagiques, ils sont adaptés à des échantillons liquides. Pour satisfaire cette condition, il est possible d'extraire trois types d'échantillons à partir du sédiment récolté : l'eau de porosité, un extrait aqueux et un extrait organique.

L'eau de porosité est constituée de l'eau interstitielle obtenue par centrifugation de l'échantillon de sédiment récolté d'après la méthode décrite dans l'annexe 6.10. D'après la théorie de la partition des polluants utilisée aussi dans la dérivation des valeurs de recommandation, si des polluants sont présents dans le sédiment, une partie est aussi présente en solution selon un équilibre de partition avec la phase solide. Ainsi si on découvre une toxicité dans l'eau de porosité, cela signifie qu'il y a aussi une toxicité liée à la fraction solide du sédiment. Par contre, cette méthode met en évidence la toxicité d'une voie de contamination différente que celle des organismes benthiques et son interprétation est donc limitée.

L'extrait aqueux est obtenu en mélangeant le sédiment avec un grand volume d'eau puis en extrayant la fraction liquide par centrifugation en suivant le protocole 6.11. Cette fraction simule l'effet qu'aurait la remise en suspension du sédiment par exemple par dragage ou lors d'une crue importante. Par contre, comme la pollution est plus diluée que dans l'eau de porosité, la toxicité attendue est la plupart du temps plus faible et on peut plus difficilement observer une toxicité.

L'extrait organique est obtenu par la dissolution des polluants dans un solvant organique, le protocole utilisé se trouve à l'annexe 6.9. L'avantage de cet extrait est qu'il rend biodisponible tous les polluants organiques du sédiment. Il permet ainsi de mesurer plus aisément des effets toxiques. Par contre, l'interprétation est plus difficile car dans le sédiment naturel, seule une partie des polluants est effectivement biodisponible pour les espèces pélagiques.

### 2.6.3 Interprétation des données

La manière la plus utilisée de représenter les résultats est de tracer une courbe dose-effet (voir figure 3<sup>6</sup>) à partir de laquelle on détermine les concentrations caractéristiques (endpoints en anglais), par exemple la concentration pour laquelle cinquante pour cent des organismes utilisés dans l'expérience ont réagi positivement ( $EC_{50}$ ).

Pour déterminer les concentrations caractéristiques d'un échantillon à partir des résultats d'un bioessai, on peut utiliser diverses méthodes : on commence par une approximation graphique en traçant la courbe dose-réponse à la main. Ensuite on peut utiliser différentes méthodes statistiques qui donnent aussi des intervalles de confiance pour la concentration  $EC_p$  (qui montre un effet sur  $p\%$  de la population mise en contact). Ici, nous utilisons le logiciel commercial graphpad Prism®<sup>7</sup> qui utilise des régressions non-linéaires. Pour le calcul de  $EC_{10}$  et  $EC_{25}$  quand il n'est pas possible de calculer des  $EC_{50}$ , nous utilisons la macro excel REG-TOX (résolution avec la méthode de Hill)

6. [http://seme.uqar.qc.ca/11\\_toxicite/toxicite\\_bioessais.htm](http://seme.uqar.qc.ca/11_toxicite/toxicite_bioessais.htm)

7. <http://www.graphpad.com/prism/>

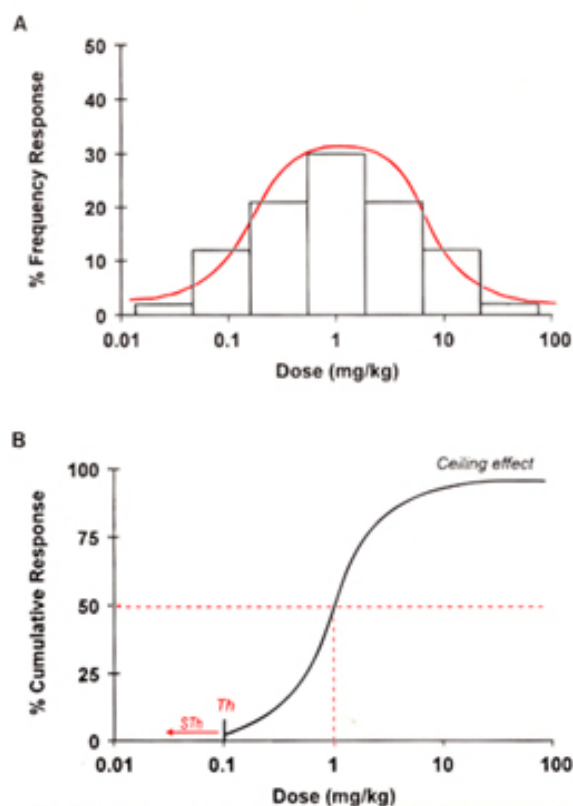


Figure 3-2. Dose-response graphs: (A) frequency-response graph and (B) cumulative-response graph showing subthreshold dose (STh), threshold dose (Th), and ceiling effect.

FIGURE 3: Exemple de courbe dose-effet

écrite par Eric Vindimian et disponible en ligne <sup>8</sup>.

De nombreux auteurs[50] recommandent de conserver une échelle logarithmique pour les courbes dose-réponses, qui correspond à une réalité biologique et qui suit logiquement le choix des concentrations d'essais choisies.

**Conversion en équivalent-sédiment** Comme les résultats des bioessais conduit sur les extraits organiques sont donnés en ‰ de solvant, il est nécessaire de convertir la concentration de DMSO en équivalent-sédiment par litre ( $eq - sed/l$ ) correspondant à la masse de sédiment sec utilisée pour l'extraction. Cela nous permettra ainsi de comparer les résultats des différents bioessais entre eux, même quand ils n'ont pas eu lieu sur les mêmes extraits.

**Expression des résultats en unité toxique** Une autre manière d'exprimer les résultats des bioessais est l'unité toxique[49], voir l'équation 3 pour son calcul à partir de l' $CE_{50}$ . L'avantage principale de l'unité toxique est qu'elle est directement proportionnelle à la toxicité observée (au contraire de la  $EC_{50}$ ). Ainsi plus un échantillon est toxique est plus son  $UT_{50}$  sera grande aussi.

8. <http://eric.vindimian.9online.fr/>

$$UT_{50} = \frac{100}{CE_{50}} \text{ avec la } CE_{50} \text{ en \%volume} \quad (3)$$

**Cas de valeurs aberrantes** Lors de bioessais, l'on rencontre parfois des valeurs qui peuvent sembler aberrantes. Se pose alors la question de l'utilisation de ces données. Environnement Canada propose plusieurs approches. Tout d'abord, il faut vérifier qu'il ne s'agit pas d'une erreur humaine : expérimentale ou d'écriture, il convient alors de vérifier les cahiers de laboratoires. Si les résultats se confirment, il faut s'interroger sur les paramètres expérimentaux ayant pu produire ces résultats. Il est par contre fortement déconseillé de supprimer les résultats qui paraissent aberrants sur cette seule observation. Le mieux est de donc faire l'analyse statistique avec et sans, plutôt que de supprimer ces valeurs, puis de faire un test non-paramétrique pour tester la vraisemblance de cette valeur et la différence des deux résultats.

Pour tester le caractère aberrant d'une données, il y a aussi la méthode empirique de l'interquartile : si la valeur est supérieure à la médiane plus ou moins l'interquartile (interquartile = 3<sup>e</sup> quartile - 1<sup>er</sup> quartile), alors la valeur est considéré comme aberrante et on peut la supprimer. Mais beaucoup de données sont nécessaires pour calculer des quartiles satisfaisants ce qui est rarement le cas pour des tests écotoxicologiques.

**Cas d'hormésis** Pour de faibles concentrations (une forte dilution des échantillons environnementaux), on peut parfois observer un effet stimulant causé par la présence d'éléments nutritifs stimulants dans l'échantillon ou à un effet stimulant des polluants pour les faibles concentrations, voir figure 4. Ces valeurs peuvent poser des problèmes pour certains calculs comme les LOEC ou NOEC. Mais pour calculer des  $EC_p$ , il vaut mieux les garder et conserver le vrai contrôle de l'expérience comme référence, tout en utilisant une régression non-linéaire.

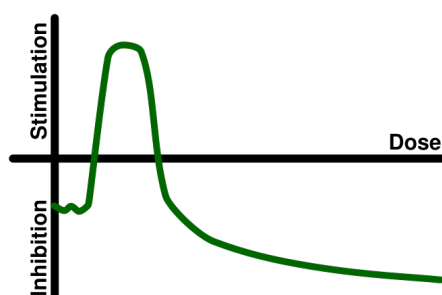


FIGURE 4: Illustration de l'hormésis

**Test de variance** Ce test statistique compare les moyennes de plusieurs échantillons sous l'hypothèse de distributions normales et nous permet par exemple de dire si deux séries de données sont significativement différentes. Le test utilisé dans cette étude est implémenté dans le programme commercial Matlab® dans la fonction "anova1" et "anova2" pour tester statistiquement la signification de respectivement un et deux paramètres pour des séries de données. Le programme calcule une p-valeur. Si cette p-valeur est inférieure à une limite arbitraire  $\alpha$ , habituellement choisie égale à 0,05 ou 0,01, alors



l'hypothèse  $H_0$  selon laquelle les deux échantillons font partie de la même distribution est rejetée et la différence de moyenne entre les échantillons est significative.

#### 2.6.4 Calcul d'un indice SED-TOX

Pour faciliter l'interprétation, on peut utiliser un indice qui agrège les résultats de tous les bioessais. Ainsi, l'indice SED-TOX a été développé par le centre Saint Laurent d'environnement Canada. Il est inspiré de l'indice BEEP (barème d'effet ecotoxique potentiel) pour calculer un risque écotoxicologique en intégrant tous les résultats d'une batterie de bioessais faite sur un échantillon de sédiment, en tenant compte des différentes voies de contamination. Une des caractéristiques de ce test est aussi la normalisation des résultats par rapport au poids de sédiment sec correspondant. La méthode utilisée a été développée par Bombardier et al.[3][4] et se trouve dans l'annexe 6.12. Lorsque des modifications ont été faites, elles sont clairement indiquées et justifiées. L'indice SED-TOX permet d'obtenir un résultat unique, qui est directement interprété comme appartenant à une classe de toxicité, voir tableau 4.

Indice SED-TOX	Classe de toxicité
0-1	pas de risque toxique
1-9	risque marginal
9-99	risque élevé
>99	risque très élevé

TABLE 4: Tableau d'interprétation des indices SED-TOX

Mais la comparaison avec une base de donnée régionale et des sites de référence reste primordiale pour définir le degré de dégradation et l'importance du site. Aussi, comme la perte d'information est importante, cet indice ne peut pas remplacer complètement l'interprétation classique des résultats.

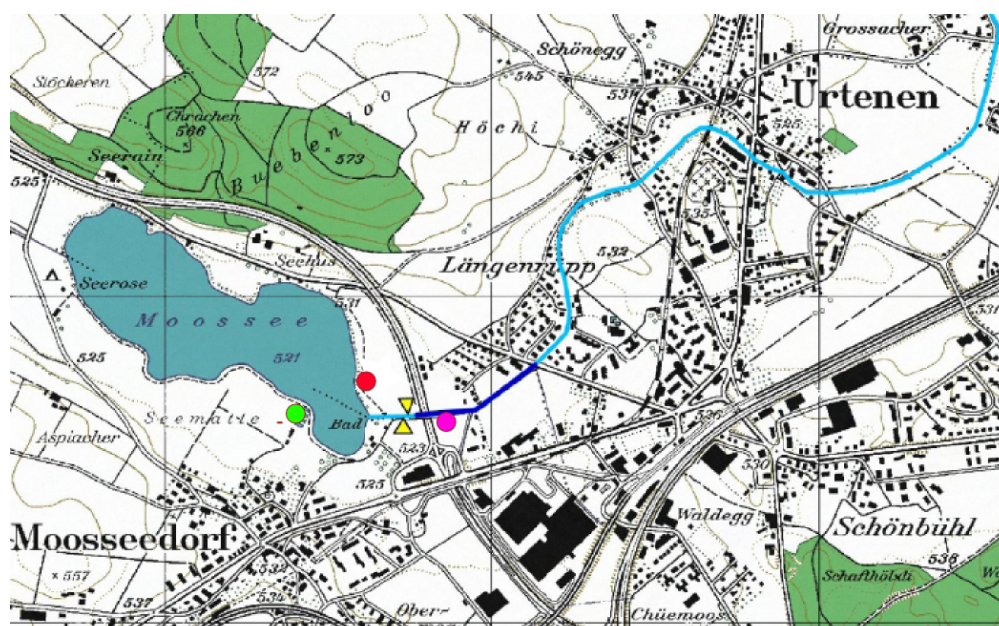


FIGURE 5: Sites d'échantillonnages choisis et sources potentielles de pollution : le point vert est le site de référence, le point rouge est le site de référence de l'étude de Jonas Margot, le point violet est le site d'échantillonnage à l'aval du déversoir d'orage et des eaux de ruissellement de l'autoroute (tout deux représentés par un triangle jaune)

### 3 Application de cette méthode à un site à Schönbühl (Be)

#### 3.1 Description de la situation et intérêt de ce site

Le site choisi est la rivière Urtenen à l'embouchure du lac Moossee près de Schönbühl dans le canton de Berne. ce site est intéressant car au même endroit, la rivière Urtenen reçoit à la fois les eaux d'un déversoir d'orage et les eaux de ruissellement d'un tronçon de l'autoroute. Comme cette rivière est relativement petite (débit moyen de 300 l/s) et très fortement modifié (canalisé), elle fournit un excellent exemple de situation où toutes les conditions sont présentes pour avoir un écosystème riverain dégradé. Pour cette raison, ce lieu est un site d'intérêt pour le canton de Berne et est étudié depuis plusieurs années. Ainsi, plusieurs stations de mesures et d'échantillonnage sont installées le long de la rivière pour contrôler régulièrement les conditions physico-chimiques. Sur un tronçon, un projet de revitalisation a eu lieu, à la fois pour un aspect paysager dans une zone d'habitation mais aussi pour l'amener à jouer à nouveau un rôle tampon.

les sources d'informations sur ce site proviennent donc des études conduites sur ce site par le canton de Berne (à travers la collaboration avec M. Elmar Scheiwiller du service environnement du canton de Berne), des bureaux d'ingénieurs mandatés[25], et aussi du projet de master rendu par Jonas Margot[38] en juin 2008 qui a déjà fait une synthèses des données précédemment produites.

## 3.2 Investigation préliminaire, données disponibles sur le site

La zone d'étude se situe dans le Bern-Mitteland, sur les communes de Moosseedorf et Urtenen-Schönbühl à environ 10 kilomètres au nord de Berne. La rivière Urtenen prend sa source à l'aval du lac Moosseenon dans la commune de Münchenbuchsee. Le ruisseau traverse ensuite la commune de Wiggiswil, avant de se jeter dans le petit lac Chli Moossee, puis dans le lac Moossee. La rivière longe ensuite la commune de Moosseedorf, traverse Urtenen-Schönbühl, puis les communes de Mattstetten, Jegensdorf, Münchringen, Kernenried, Zauggenried, Fraubrunnen, Schalunen, et Bätterkinden, avant de se jeter finalement dans l'Emme. Le bassin versant total de l'Urtenen à une surface de 96 km<sup>2</sup>, dont 29% en forêt, 18% urbanisés (y compris les infrastructures de transports), le reste est en zone agricole (Hydra, 1995). La superficie du bassin versant à la sortie du lac Moossee vaut 18 km<sup>2</sup>. Son altitude moyenne est de 563 m, le lac se situant à 521 m (Spreafico, 1992). Le bassin versant naturel à l'amont du lac se situe essentiellement en zone agricole (grandes cultures). Plus de 100 hectares du bassin sont occupés par un golf (33 trous). Les principales zones urbanisées de ce bassin versant sont la petite ville de Münchenbuchsee (9600 habitants) et le village de Moosseedorf (3460 habitants), ainsi que leurs zones industrielles respectives. Le bassin versant est entrecoupé d'un réseau dense d'infrastructures de transports (noeud autoroutier entre A1 et l'A6, routes cantonales, voies CFF). La partie du cours d'eau qui nous intéresse se trouve juste à l'aval du lac Moossee. Ce tronçon reçoit les eaux de ruissellement d'un grand tronçon d'autoroute (environ 7 ha), ainsi que les eaux mixtes du déversoir d'orage de Bad, principal déversoir du réseau d'assainissement qui est relié à environ 15'000 habitants (communication personnelle de Elmar Scheiwiller). Une à deux fois par an, les eaux du déversoir d'orage doivent être déviées en partie vers le lac De Moossee pour éviter que le pont de l'autoroute en aval du déversoir de Bad ne soit submergé. Les eaux usées à l'amont de ce déversoir proviennent principalement de Münchenbuchsee et Moosseedorf, ainsi que de petites communes comme Diemerswil, Wiggiswil, Deisswil. Les eaux usées sont ensuite évacuées à la STEP de Holzmühle, 6 kilomètres plus au nord, qui a une capacité de 50'000 équivalents habitants.

cette description du site provient du rapport de Jonas Margot auxquelles ont été rajouté des données fournies par Elmar Scheiwiller.

## 3.3 Choix des stations d'échantillonnage

Pour la présente étude, deux stations d'échantillonnage ont été choisies : un site de référence et le site directement sous l'influence du déversoir de Bad et des eaux de ruissellement de l'autoroute (voir figure 5). Le site de référence choisi est différent de celui de Jonas Margot et a été choisi sur la rive droite du lac Moossee (figure 6). En effet, durant son étude Jonas Margot[38] avait observé que son site de référence était aussi pollué et avait fait l'hypothèse que la contamination était causée par une ancienne décharge située sur la rive gauche du lac. Le site à l'aval du déversoir d'orage et de l'autoroute a été sous-échantillonné en deux endroits. le premier point de sous-échantillonnage est situé juste après le pont de l'autoroute (figure 7a) et le deuxième point est situé une trentaine de mètres plus loin sous la frondaison (figure 7b). Le deuxième site d'échantillonnage

est le même que Jonas Margot.

Le site de référence est situé en bordure du lac avec des sédiments peu profonds, le site est entouré de roseaux. Le fond est vaseux mais avec des cailloux assez grossiers rendant l'extraction des sédiments assez lentes. La description des sédiments extraits est dans le tableau 5. Pour le deuxième site, la première station de sous-échantillonnage est assez profonde et les sédiments fins se trouvent surtout près des berges. Il y a aussi de nombreux macrophytes flottants entre deux eaux. La deuxième station de sous-échantillonnage est délicatement ombragée par des noisetiers mais une forte odeur nauséabonde accueille celui qui croyait avoir déniché un joli coin bucolique. Aussi le fond de cette section est recouvert d'une épaisse couche de vase ( $> 30\text{cm}$ ).



FIGURE 6: Lieu d'échantillonnage du site de référence



(a) Lieu du premier sous-échantillonnage



(b) Lieu du deuxième sous-échantillonnage

FIGURE 7: Lieux d'échantillonnage pour le site à l'aval de déversoir de Bad et de l'autoroute



### 3.4 Pluviométries et débitmétrics

Il y a été choisi d'échantillonner après un épisode orageux (entraînant le charriage de matière en suspension) pour avoir des sédiments fraîchement déposés. Comme nous voulons déterminer l'effet toxique des déversoirs et des eaux de ruissellement d'auto-route, il est préférable d'échantillonner rapidement après un épisode orageux. En effet, les différents polluants ont des temps de demi-vie relativement différents les conditions benthiques : de plusieurs heures ou jours pour l'ammonium ou certains HAPs à plusieurs années pour les plus persistents comme les PCBs.

Le jour de l'échantillonnage, le 26 octobre 2009, le débit moyen est de 146 l/s et le débit médian sur les deux derniers mois est de 149 l/s (voir figure 8b). On observe donc que le débit est redevenu stable après les pluies du 23 et 25 octobre (voir figure 8a). Les précipitations données proviennent d'une station d'échantillonnage située à Mattstetten mais semble être représentatives des pluies du bassin versant de l'Urtenen comme les pics de précipitations correspondent à les pics de débit.

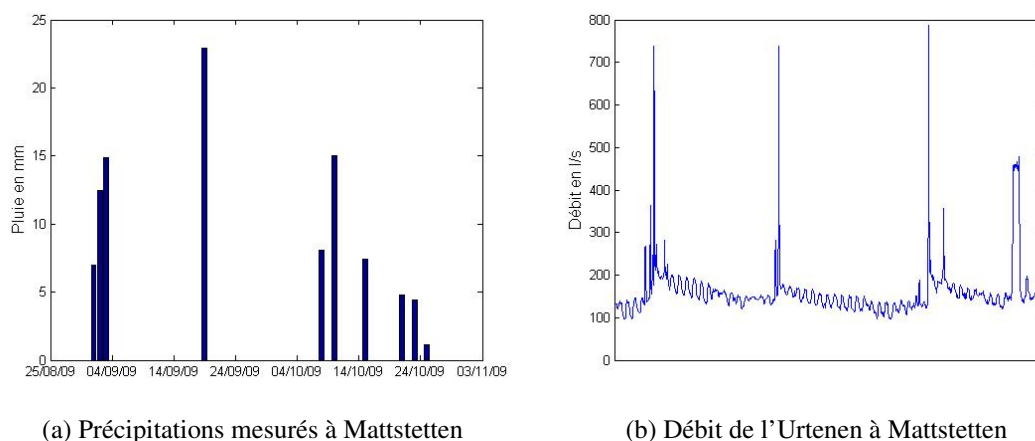


FIGURE 8: Débit de l'Urtenen et précipitations à Mattstetten durant les deux mois précédents l'échantillonnage

### 3.5 Résultats des analyses physico-chimiques

#### 3.5.1 Granulométrie

Les résultats de la distribution granulométrique sont dans le tableau 7. Les sédiments du site de référence contiennent plus de sédiments grossiers (57% est supérieure à  $200\mu\text{m}$ ) alors que la plus grosse fraction des sédiments du site 2 est composée des sédiments fins (56% est comprise entre 50 et  $200\mu\text{m}$ ). Aussi, les sédiments du site 2 contiennent une plus grande fraction de sédiment plus petit que  $50\mu\text{m}$  (Argiles + Limons). Cette importante fraction de fines est donc vraisemblablement l'apport des particules emportées par le déversoir d'orage et les eaux de ruissellement de l'autoroute.

Numéro de l'échantillon	Paramètres physico-chimiques	hauteur d'eau
1 : rive droite du lac	pH : 8,18 $O_2$ : 8,60 mg/l Eh : 0,54 mS/cm Temp : 13,2°C	20-50 cm
2 : aval du déversoir et de l'autoroute	pH : 8,04 $O_2$ : 8,10 mg/l Eh : 0,56 mS/cm Temp : 13,1°C	30-80 cm

TABLE 5: Mesures aux stations d'échantillonnage

Numéro de l'échantillon	Observations	Profondeur de sédiment récolté
1 : rive droite du lac	Texture : vaseux Couleur : brun foncé Odeur : vase et humus	5 cm
2 : aval du déversoir et de l'autoroute	Texture : visqueux Couleur : brun-gris Odeur : forte odeur d'égout nauséabonde	1 cm

TABLE 6: observations sur les sédiments prélevés

Site	Teneur en eau en % poids	Argile ( $< 2\mu\text{m}$ )	Limon ( $2-50\mu\text{m}$ )	Sédiment fin ( $50-200\mu\text{m}$ )	Sédiment grossier ( $200-1000\mu\text{m}$ )
1	54	5	10	28	57
2	53	8	20	56	15

TABLE 7: Teneur en eau et distribution granulométrique des sédiments

### 3.5.2 Représentativité du volume d'échantillonnage

L'échantillon a été extrait avec une benne de type ponar d'un volume approximatif de 1,5 litre. Pour estimer l'erreur d'échantillonnage induit par l'hétérogénéité des sédiments, on utilise l'approche de Pierre Gy. Cette méthode a été implémentée à l'EPFL par N. Chèvre, L. Rossi, L. et L. Rumley et est disponible sur internet <sup>9</sup>.

On utilise les ordres de grandeur de granulométrie mesurés, les ordres de grandeurs des concentrations de polluants attendues, et les facteurs définis par défaut. Tous les paramètres utilisés sont dans le tableau 8. On calcule ainsi une erreur d'échantillonnage de 37%.

	Moyenne	Minimum	Maximum
Concentration (en mg/l)	1e-3	1e-6	1
Taille particulaire en $\mu\text{m}$	100	63	2000
Factor de libération (B)	0.2	0.2	0.4
Paramètre de forme(F)	0.5	0.5	0.5
Distribution granulométrique(G)	0.25	0.25	0.5

TABLE 8: Données pour le calcul de la représentativité du volume

### 3.5.3 Soufre

Le soufre élémentaire est analysé dans les sédiments à cause de son influence possible sur les bioessais. En effet, il est extrait dans le dichlorométhane et à un effet toxique démontré pour les test sur *Vibrio fischeri* ( $EC_{50}$  à 15 minutes de  $12\mu\text{g S/l}$ ) et *Daphnia magna* ( $EC_{50}$  à 48h de  $800\mu\text{g S/l}$ )[44]. Cela permet aussi de vérifier si l'échantillonnage a bien eu lieu sur la partie oxygène supérieure des sédiments. Une forte concentration indiquerait que la partie anoxique a été entamée par la benne.

Comme les concentrations mesurées (voir le tableau 9) sont respectivement 20 fois et 15 fois plus petites pour les deux sites que la valeur de  $EC_{50}$  la plus petite (celle des *Vibrio fischeri*), on peut donc estimer avec confiance que le soufre élémentaire n'aura pas d'influence significative pour les tests Microtox® et sur les bioessais effectués sur les *Daphnia magna*, et que l'échantillonnage s'est déroulé correctement sur la partie oxygène de la couche de sédiment du lit.

Site d'échantillonnage	Soufre en $\mu\text{g S}^0$ / g sédiment sec	Soufre en $\mu\text{g S}^0$ / ml DMSO
1	0,11	0,52
2	0,17	0,78

TABLE 9: Concentrations de soufre élémentaire analysées

9. <http://www.samplinghelper.com>

### 3.5.4 Ammonium

L'ammonium est reconnu comme une source de pollution pour les rivières et les sédiments. Dans notre situation, la principale source possible sont les déversoirs d'orage dans lesquels s'écoulent des eaux domestiques concentrées en urines. La forme la plus toxique d'ammonium est sa forme anionique ammoniacale  $NH_3$ . La partition entre la forme ionique  $NH_4^+$  et anionique dépend principalement de la température et du pH. Une formulation couramment utilisée, notamment implémentée dans le programme REBEKA[47] décrit la concentration de  $NH_3$  en fonction de ces paramètres[20].

$$[NH_3] = [NH_4] \frac{1}{10^{pK_s - pH} + 1} \text{ avec } pK_s = 0,09018 + \frac{2729,9}{273,2 + T} \quad (4)$$

La mesure de l'ammonium a été faite par chromatographie ionique et détecteur conductimètre (appareil ICS 3000 de Dionex, colonne CS16, suppresseur CSRS4) sur les eaux de porosité préalablement filtrées à  $0.2\mu m$ . Les paramètres physico-chimiques utilisés pour le calcul de la concentration d'ammoniac sont inscrits dans le tableau 18 et sont ceux analysés deux jours après l'échantillonnage, ce qui est en accord avec les recommandations d'Environnement Canada[50]. Les valeurs d'ammonium et ammoniac finalement obtenues sont dans le tableau 10.

Echantillon	Ammonium en mg/l	Ammoniac en $\mu g/l$
1	4,0	22,6
2	4,4	25,6

TABLE 10: Mesures d'ammonium dans l'eau interstitielle

On compare les valeurs d'ammoniac avec des valeurs de toxicité tirées de la littérature pour savoir si elles peuvent avoir un effet toxique sur les bioessais et masquer l'effet toxique d'autres polluants. Pour les bioessais sur *Daphnia magna*, il y a des valeurs disponibles relativement différentes avec des  $LC_{50}$  de 4,18 mg/l[42] et de 0,530 g/l[15]. Nos concentrations sont 20 fois plus petites que la plus petite valeur citée ce qui semble valider le fait que l'ammoniac a peu d'effet sur nos bioessais conduit sur les *Daphnia magna*. Pour les tests sur *Ceriodaphnia dubia*, on trouve qu'une valeur de 4,8mg/l entraîne 50% de la reproduction sur 7 jours et qu'une valeur de 14 g/l entraîne 50% de mortalité sur 7 jours[17]. Pour le test sur *Brachionus calyciflorus*, une valeur de 4,6 mg/l entraîne 50% de mortalité après 1 jours[52].

Aucune donnée n'a été trouvée pour les *Vibrio fischeri*, les *Pseudokirchneriella subcapitata* et les *Lemna minor*. Toutefois, on remarque que pour les espèces d'essais dont des valeurs sont disponibles que les concentration d'ammoniac calculées sont au moins 20 fois supérieure, donc l'ammoniac n'interfère probablement pas sur les bioessais concernés. Mais il aurait été mieux d'utiliser des valeurs de NOEC ou LOEC pour s'assurer du non-effet de l'ammoniac si ces valeurs avaient été disponibles.



Site d'échantillonnage	Co en ppm	Ni en ppm	Cr en ppm	Pb en ppm	Cu en ppm	Zn en ppm	Cd en ppm
site 1 : 2009	2,2	9,0	6,8	17,1	22,3	58,1	-
site 2 : 2009	5,2	22,6	33,9	23,3	74	320,3	-
site 1 : 2008	2,5	15,6	13,1	17,9	14,4	51,2	0,6
site 2 : 2008	3,3	16	27,8	50,2	65,2	355,5	1,1
site 2 : 2007	-	16,4	27,3	45,4	104,8	460	> 0,8
site 1 : fluo	36	6	36	38	34	74	-
site 2 : fluo	27	17	99	26	77	323	-
TEC	-	22,7	43,4	35,8	31,6	121	0,99
PEC	-	48,6	111	128	149	459	4,98

TABLE 11: Résultats des analyses des métaux lourds dans les sédiments

### 3.5.5 Métaux lourds

Tous les résultats sont reportés dans le tableau 11. Le cadmium est sous la limite de détection pour la mesure par ICP-OES et n'est pas détecté par fluorescence X. La mesure de Cobalt est indiquée mais comme il est juste au-dessus de la limite de détection, sa concentration doit être considérée uniquement à titre indicatif.

#### Comparaison avec des recommandation sur la qualité des sédiments RQS

On utilise les valeurs de TEC (en anglais, Threshold Effect Concentration : concentration limite d'effet) et PEC (en anglais, Probable Effect Concentration : concentration d'effet probable) dérivées par MacDonald[35]. la TEC définit la valeur limite en dessous de laquelle on n'attend pas d'effet néfaste sur l'écosystème benthique. La PEC est la concentration en dessus de laquelle un effet néfaste sur l'écosystème benthique est fréquemment observable. Pour les concentration situé entre les deux, un effet toxique est possible mais rien de plus ne peut être dit sur cette seule base.

Pour le site de référence, tous les métaux ont une concentration se situant sous la TEC, ils ne présentent donc pas de risque toxique. Pour le site 2, trois métaux sont encore sous la TEC (Ni, Cr et Pb). Comme les valeurs pour le Cu et le Zn sont entre la TEC et la PEC, on ne peut conclure ni sur la forte probabilité de toxicité ni sur son absence, mais un effet toxique reste possible.

En conclusion, pour les métaux, le site de référence semble satisfaisant dans son rôle car toutes les concentrations sont sous la TEC. Mais pour le site 2, le cuivre et le zinc pourraient représenter un risque toxique mais sans qu'il soit possible de dire plus.

La Commission Internationale pour la Protection du Rhin<sup>10</sup> (CIPR), dont est membre la Confédération Helvétique propose des classes pour caractériser la qualité des sédiments selon leurs concentrations en métaux (très bon, bon, moyen, mauvais ou très mauvais définit dans le tableau 12). Pour le site 1, tous les métaux sont classés "très bon". Pour le site 2, Le Ni et le Pb sont dans la classe "très bon". le Cu est classé "moyen" et le Zn "mauvais". Ces valeurs vont dans le même sens que les valeurs de PEC et TEC en

10. <http://www.iksr.org/>

Catégorie	Ni en ppm	Cd en ppm	Pb en ppm	Cu en ppm	Zn en ppm
Très bon	$\leq 25$	$\leq 0,5$	$\leq 50$	$\leq 25$	$\leq 100$
Bon	$> 25 - 50$	$> 0,5 - 1$	$> 50 - 100$	$> 25 - 50$	$> 100 - 200$
Moyen	$> 50 - 75$	$> 1 - 1,5$	$> 100 - 150$	$> 50 - 75$	$> 200 - 300$
Mauvais	$> 75 - 100$	$> 1,5 - 2$	$> 150 - 200$	$> 75 - 100$	$> 300 - 400$
Très mauvais	$> 100$	$> 2$	$> 200$	$> 100$	$> 400$

TABLE 12: Classification de la qualité des sédiments par les métaux d'après la CIPR

mettant en garde contre l'effet du cuivre et surtout du zinc. Nous n'avons par contre pas d'information sur la manière dont les classifications du CIPR sont dérivés.

Si l'on compare les valeurs de référence de la CIPR avec les TEC-PEC, on remarque que les valeurs de PEC pour le Zn et Cu sont classés comme "très mauvaises", pour le Pb comme "moyen" et pour le Ni comme "bonne". Les valeurs de la CIPR sont donc plus protectrices pour le cuivre et le zinc que pour le plomb et le nickel. Les valeurs de la CIPR pourraient donc sous-estimer le risque causé par le plomb et le nickel dans les sédiments.

**Comparaison avec les valeurs mesurées par l'OFEV en 2003** L'office fédéral de l'environnement suisse a conduit une étude sur les micropolluants dans les sédiments d'une dizaine de rivières suisses en 2003, principalement des affluents du Rhin, du Rhône, du Tessin et de l'Inn[45].

Malgré une différence importante dans le protocole expérimental (dans l'étude de l'OFEV, les analyses ont été faites sur la fraction inférieure à  $63\mu\text{m}$ ), la comparaison est faite entre les concentrations de notre étude et les valeurs médianes, minimum et maximum basée sur 80 échantillons, voir le tableau 13. Il a été montré dans de nombreuses études que la fraction fine de sédiment comprenait la partie la plus importante de polluants, métaux lourds compris, ce qui implique que nos valeurs sont sous-estimées par rapport aux valeurs de l'étude de l'OFEV.

Pour le site 1, toutes les concentrations de métaux sont sous la médiane et même relativement proche du minimum pour le Ni et le Cr. Pour le site 2, le Ni et le Pb restent sous la médiane suisse, le Cr est très proche de la médiane et le cuivre et le zinc sont plus proches des valeurs maximales observées en Suisse. Du point de vue du cuivre et du zinc donc, le site 2 se trouve parmi les sites suisses les plus pollués.

**Comparaison avec des analyses antérieures** Les données de 2007 proviennent d'analyses faites par le canton de Berne et ont été fournies de manière personnelle par Elmar Scheiwiller. Les données de 2008 proviennent du travail de master de Jonas Margot[38]. Toutes les données sont dans le tableau 11.

La comparaison des concentrations des métaux des deux sites de références (de notre étude et de celle de Jonas Margot), montre que pour 4 métaux (Cu, Zn, Co, Pb), la différence est inférieure à 15%. Pour le Ni et Cr, les concentrations sont plus élevées sur le site de référence de Jonas Margot (respectivement + 73% et + 92%). Le site de

Site d'échantillonnage	Ni en ppm	Cr en ppm	Pb en ppm	Cu en ppm	Zn en ppm
1 : ICP-OES	9,0	6,8	17,1	22,3	58,1
2 : ICP-OES	22,6	33,9	23,3	74	320,3
Médiane	32,6	32,3	26,7	34,0	101
Minimum	12,5	8,3	5,0	5,7	17
Maximum	117	103	72,5	87,2	516

TABLE 13: Mesures des métaux lourds et valeurs de l'étude de l'OFEV, mesurées sur 80 échantillons.

référence de Jonas Margot est donc plus pollué par les six métaux lourds mesurés, voir figure 9a.

Pour le site "pollué", entre 2007 et 2008, les résultats restent proches (sous les 20% de différence) sauf le cuivre qui diminue de 38%. Comme la valeur d'écart type n'est pas disponible pour les valeurs de 2007, on ne peut pas dire ce qui est significativement différent ou non (voir figure 9a).

Pour le site "pollué", entre 2008 et 2009, Les résultats restent aussi dans le même ordre de grandeur : sous les 20% de différence pour le Cu, Cr et Zn (alors que les déviations standards de ces mesures sont aussi de l'ordre de 20%). La concentration en Ni et Co sont respectivement 30% et 37% plus élevées pour la présente étude. Par contre, la concentration en plomb est 115% moins élevée.

On remarque donc que, sauf pour quelques métaux, les concentrations sont assez stables en 2007 et 2009 aussi bien à l'amont qu'à l'aval du déversoir d'orage de Bad.

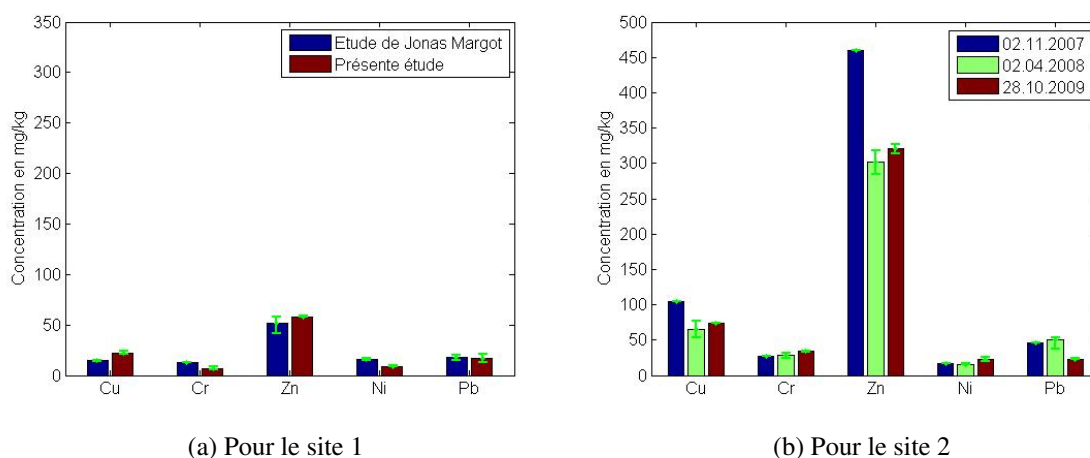


FIGURE 9: Comparaison des mesures de métaux faites en 2007, durant l'étude de Jonas Margot (02.04.2008) et durant la présente étude (28.10.2009)

**Comparaison entre les analyses ICP-OES et fluorescence X** les analyses des métaux lourds dans les sédiments ont été faites de deux manières différentes : par ICP-OES après extraction par eau régale et par fluorescence X. Les résultats sont dans le tableau 11.

L'analyse du chrome donne des résultats très différents selon les analyses : 5 fois et 3 fois plus grand par fluorescence X. Une des analyses du plomb et du cuivre montrent aussi une dérive (respectivement 123% et 53%). Les autres analyses donnent des résultats avec des déviations de moins de 30% qui sont acceptable dans le cadre de mesures croisées.

Une étude plus approfondis, par exemple une campagne de mesure inter-laboratoire pourrait permettre de mieux comprendre les différences entre les résultats et de pouvoir déterminer la méthode la plus appropriée pour de telles mesures. La fluorescence X présente l'intérêt de ne pas travailler avec des acides concentrés mais a une limite de détection plus grande.

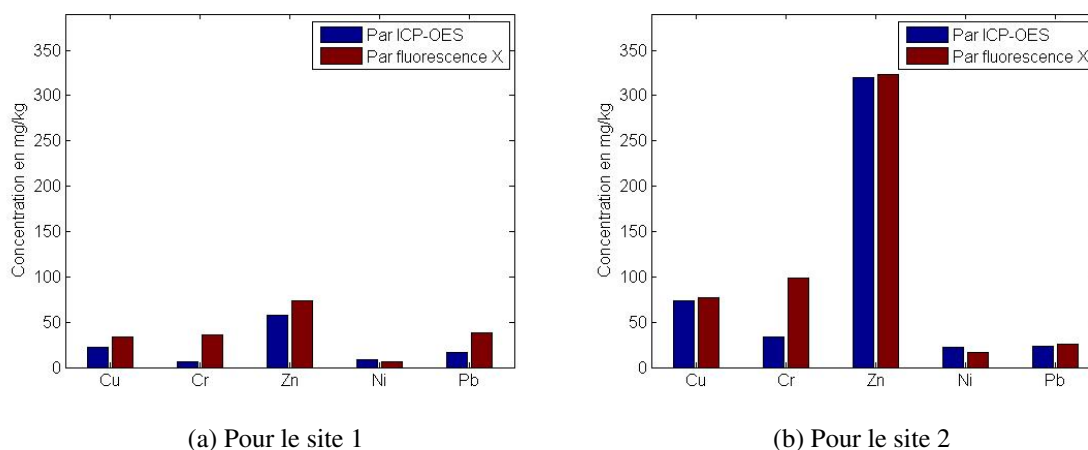


FIGURE 10: Comparaison des mesures de métaux faite par ICP-OES et Fluorescence X

**Conclusion des analyses de métaux lourds** Le risque toxique lié aux métaux semble très faible sauf pour le zinc et le cuivre, qui pourraient notamment agir de manière inattendu en mélange avec d'autres polluants présents.

Aussi le mercure  $H_g$  n'a pas été mesuré bien qu'il fasse partie des huit métaux d'intérêt couramment étudiées et pour lesquels notamment MacDonald et al.[35] donnent des valeurs de recommandation.

HAPs	1 en ng/g	2 en ng/g	1 Jonas en ng/g	2 Jonas en ng/g	TEC en ng/g	PEC en ng/g
Naphthalène	D.L.	17,9	4	16,1	176	561
Acénaphthène	D.L.	18,4	D.L.	11,4		
Fluorène	D.L.	28,1	1,7	27	77	536
Phénanthrène	82	475	34	581	204	1170
Anthracène	19	47	6	98	57	845
Fluoranthène	211	1905	51	1673	423	2230
Pyrène	169	1608	73	1345	195	1520
Benzo (a) Anthracène	100	560	45	653	108	653
Chrysène	87	930	44	840	166	1290
Benzo (e) Pyrène	96	1032	D.L.	972		
Benzo(b)Fluoranthène	66	720	39	731		
Benzo (k) Fluoranthène	48	456	27	451		
Benzo (a) Pyrène	132	751	59	762	138	1450
Dibenz (a,h) Anthracène	12	121	8	D.L.	33	
Benzo (g,h,i) Pérylène	74	885	43	811		
Indéno (1,2,3c,d) pyrène	70	623	59	893		
Σ HAPs mesurés	1166	10177	493	9864		
HAPs Totaux					1610	22800

TABLE 14: Résultats des analyses des HAPs dans les sédiments

### 3.5.6 Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

les résultats des analyses des hydrocarbures aromatiques polycycliques sont fournis dans le tableau 14.

#### Comparaison avec des recommandations sur la qualité des sédiments

**RQS** Parmi les 16 HAPs prioritaires fixés par L'USEPA, Macdonald et al.[35] ont calculés des TECs pour 10 d'entre eux et des PECs pour neuf espèces. Pour le site 1, aucune des 10 valeurs de TEC n'est atteinte. Prise individuellement, les HAPs ne présentent donc pas de risque ecotoxicologique.

Pour le site 2, seule l'anthracène est toujours sous la TEC. Les 8 autres PAHs sont entre les valeurs de TEC et PEC sauf le pyrène qui est au dessus de la PEC, indiquant un effet toxique probable. Les concentrations de chrysène et fluoranthène sont très proches des valeur de PEC bien qu'encore inférieurs. Toutefois il est recommandé par un grand nombre d'auteurs[58] de ne pas considérer une seule concentration de polluant au-dessus de la PEC comme suffisant pour considérer que cette espèce chimique ait un effet toxique probable. On ne peut donc pas tirer de conclusions des valeurs de HAP prises individuellement.

Comme les HAPs sont une classe de polluant aux propriétés et aux effets proches, l'utilisation des valeurs de recommandation pour les somme de PAHs doivent être privilégiés. On considère la somme des 16 HAPs prioritaires comme étant les "HAP totaux".

En effet, Macdonald et al. n'indiquent pas explicitement sur combien de HAPs il s'est référé pour calculer ces recommandations mais il se base sur l'étude de Swartz[55] qui lui en utilise 13 différents pour son calcul. On observe ainsi que la somme des HAPs est sous la TEC pour le site 1 qui ne présentera donc pas de risque toxique lié aux HAPs. Pour le site 2, on se trouve entre la TEC et la PEC, on ne peut donc pas conclure pour le site 2. En effet, l'influence de nombreux facteurs environnementaux et l'effet de mélange avec d'autres classes de polluants ne peuvent pas être pris en compte ici.

**Comparaison avec les valeurs mesurées par l'OFEV en 2003** L'ensemble des HAPs ont été mesurés en 2003 par l'OFEV[45] pour les principales rivières suisses. On reporte ici les valeurs médiane, minimum et maximum mesurées pour 80 échantillons qui sont respectivement de 520, 20 et 3940 ng/g de HAP. Le site 1 est donc au-dessus de la médiane (avec une valeur d'ailleurs deux fois plus grande) et le site 2 a une valeur 3 fois supérieure au maximum alors mesuré. Du point de vue suisse, le site 1 est moyennement pollué et ne représente donc pas le bruit de fond suisse pour la pollution aux HAPs. Le site 2 est très pollué en PAHs en comparaison et mérite bien son statut de site d'intérêt, même si le risque pour la biocénose benthique n'a pas été montré clairement pas les valeurs de recommandations.

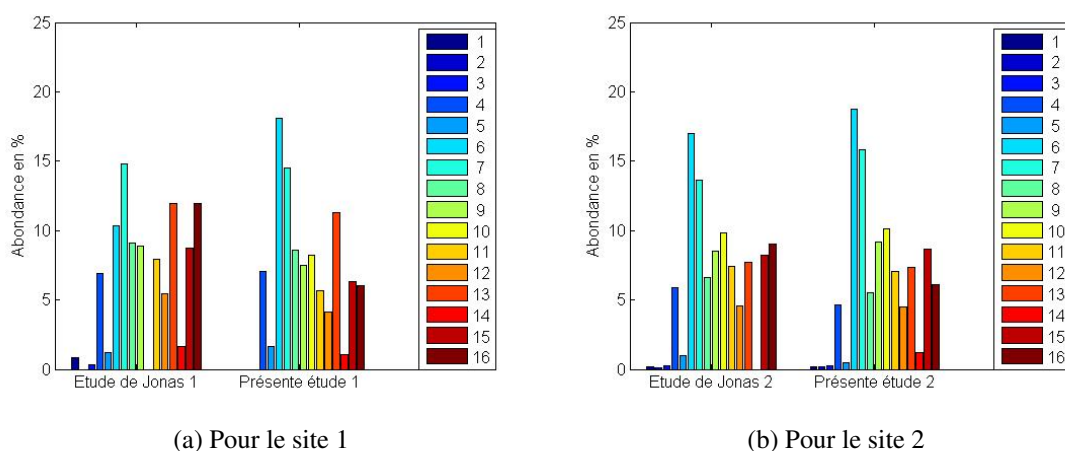


FIGURE 11: Comparaison des empreintes HAPs entre la présente étude et celle de Jonas Margot

**Comparaison avec l'étude de Jonas margot** Pour le site de référence, 12 concentrations sur les 16 mesurées sont plus grandes pour la présente étude de plus de 35% (voir figure 12a), sauf le Indéno(1,2,3c,d)pyrène qui est supérieur de seulement 16%.

Pour le site 2, il y a peu de différences pour 14 espèces (avec une différence inférieure à 22% entre les deux études, voir figure 12b). Seule l'acénaphène a une concentration de 38% plus grande et l'anthracène a une concentration 108% fois plus faible pour la présente étude.

L'étude des empreintes des HAPs peut fournir des informations sur l'origine des substances. L'empreinte est définie comme la répartition d'abondance caractéristique d'un échantillon, ainsi si deux échantillons ont une empreinte qui n'est significativement différente, on peut supposer que la source de pollution est la même. Mais le fait que les différents HAPS n'aient pas les même temps de demi-vies dans l'environnement limite une interprétation basée uniquement sur l'étude des empreintes. Les empreintes se trouve aux figures 11a et 11b.

Pour le site 1, un test de variance ANOVA montre que la différence est significative entre les deux études (p-valeur = 0.016 < 0.05). Les empreintes sont dans la figure. Pour le site 2, le test ANOVA montre que les deux empreintes ne sont pas significativement différentes (p-valeur = 0.92 > 0.05). On voit ainsi que la source de HAPs semble provenir toujours de la même source et de manière constante.

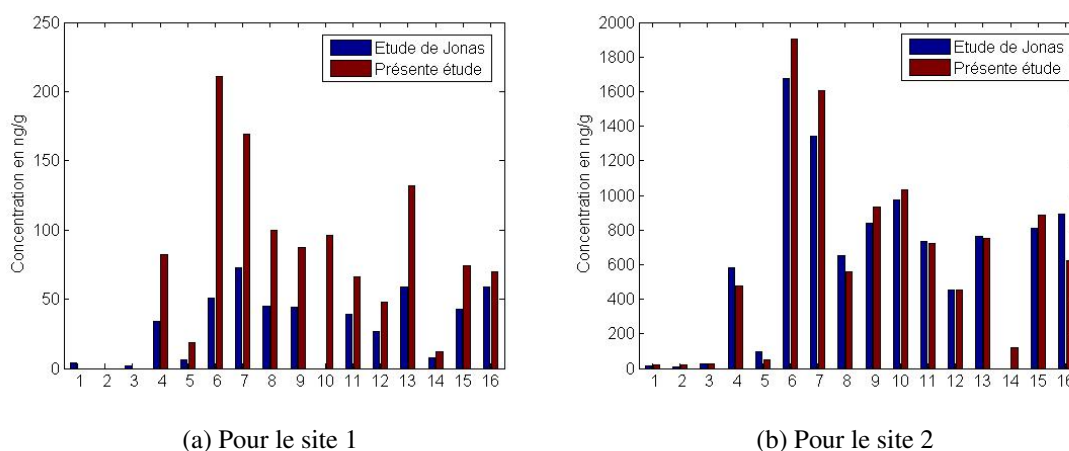


FIGURE 12: Comparaison des concentrations de HAPs entre la présente étude et celle de Jonas Margot

**Identification de l'origine des HAPs** De nombreux auteurs ont étudiés les ratios de concentration de HAPs pour en déterminer l'origine[32][53]. ces ratios sont basés sur les différentes des propriétés des différents PAHs : leurs réactivités, leur stabilités thermodynamiques ou leurs poids moléculaires.

Les différents indices utilisés sont : fluoranthène/pyrène, phénanthrène/anthracène et la somme des HAPS avec une faible masse moléculaire sur la somme des HAPS avec une grande masse moléculaire (notée LMW/HMW et calculé d'après l'équation 5). Les concentrations de naphthalènes, acenaphthènes et fluorènes ne sont utilisées dans aucun indice à cause de la plus grande volatilité de ces molécules.

$$LMW/HMW = \frac{Phe + An + Py + Flt}{BaA + Chry + BbF + BkF + BaP + BeP + DBA + Bper + Ipy} \quad (5)$$

Comme le phénanthrène est thermodynamiquement plus stable que l'anthracène, un grand ratio Phén/Anth indique une origine pétrogénique (due par exemple à des déversement d'hydrocarbures). De même le fluoranthène et le pyrènes qui sont tous deux formés lors de la condensation à haute température de composé aromatique de faible masse moléculaire, indiquent que l'origine est pyrogénique (issue de la combustion incomplète d'hydrocarbures) pour un grand ratio. Kose et al.[32] fixent des valeurs limites pour ces ratios : si Fluo/Pyr<1 et Phén/Anth>10, alors l'origine des PAHs est pétrolière, si Fluo/Pyr>1 et Phén/Anth<10, alors l'origine vient de la combustion. Les ratios calculés sont inscrit dans le tableau 15.

Pour le site 1, on observe ainsi que les deux ratios indiquent la combustion comme origine des PAHs. Alors que pour le site 2, les ratios donnent un résultat moins univoque si l'on se base uniquement sur la clé d'interprétation de Kose et al.. Le ratio Fluo/Pyr>1 indique une origine pyrogénique et le ratio Phén/Anth>10 indique la présence hydrocarbures non brûlés. Les origines des HAPs seraient donc multiples.

Pour les deux sites, un ratio LMW/HMW<1 indique une origine pyrolytique pour les HAPs[53].

Pour le site 2, l'origine des HAPs pourrait donc être à la fois des résidues de combustion incomplète mais aussi des rejets d'hydrocarbures. Ces résultats vont dans le sens d'une pollution provenant des ruissellement de l'autoroute avec des hydrocarbures, brûlé et imbrûlés.

Ratio calculés	Site 1 Présente étude	Site 2 Présente étudev	Site 1 Etude de Jonas	Site 2 Etude de Jonas
Fluo/Pyr	1.2	1.2	0.7	1.2
Phén/Anth	4.3	10.1	5.7	5.9
LMW/HMW	0.7	0.7	0.5	0.1

TABLE 15: Ratios calculés pour l'identification de l'origine des HAPs

**Conclusion des analyses de HAPs** On observe bien la présence de HAPs dans les deux sites même si la somme des HAPs est près de 10 fois plus importante dans le site 2. Bien que ce site soit un site très pollué, son risque toxique n'est pas clairement indiqué par la valeur de PEC. Le risque lié au mélange entre plusieurs classes de pollunats n'a pas été pris en compte.



### 3.5.7 Polychloro-byphényles

les concentrations de polychlorobiphenyles (PCBs) mesurées sont inscrites dans le tableau 16. La concentration des PCBs totaux est calculée selon l'estimation que la somme des PCBs mesurés vaut 40% des PCBs totaux[48].

PCBs	1 en ng/g	2 en ng/g	1 Jonas en ng/g	2 Jonas en ng/g	TEC en ng/g	PEC en ng/g
Congénère 28	D.L.	1,26	0,05	D.L.		
Congénère 52	D.L.	2,89	0,10	1,10		
Congénère 101	D.L.	5,58	0,11	10,21		
Congénère 105	D.L.	1,73	0,12	D.L.		
Congénère 118	D.L.	7,69	0,38	10,37		
Congénère 128	D.L.	1,04	0,08	0,93		
Congénère 138	1,53	12,38	0,75	9,72		
Congénère 149	0,24	13,25	0,35	5,38		
Congénère 153	D.L.	12,71	0,72	11,55		
Congénère 156	D.L.	2,11	0,09	2,20		
Congénère 170	D.L.	1,26	0,17	1,70		
Congénère 180	D.L.	5,24	0,29	5,52		
Σ PCBs mesurés	1,77	67,15	3,21	59,8		
PCBs totaux	4,4	167,9	8	146,7	58,68	676

TABLE 16: Résultats des analyses des PCBs dans les sédiments

#### Comparaison avec des recommandations sur la qualité des sédiments

**RQS** Pour le site 1, la concentration estimée des PCBs totaux est sous la TEC. Pour le site 2, la concentration estimée des PCBs est entre la TEC et la PEC (environ 4 fois plus petite que la PEC). On ne peut donc conclure mais on ne peut pas écarter un risque écotoxicologique du aux PCBs.

#### Comparaison avec les valeurs mesurées par l'OFEV en 2003

Dans l'étude menée par l'OFEV[45] en 2003 sur 80 échantillons provenant de différentes rivières suisses, les médianes, minimum et maximum reportés sont respectivement, 7,9, 0,35 et 58 ng/g. le site 1 a donc une concentration sous la médiane (2 fois plus petite) et le site 2 est largement au dessus (près de 3 fois supérieur) à la concentration maximale. Le site 1 semble donc trop pollué pour jouer le rôle de valeur de bruit de fond et le site 2 est un site suisse très pollué en PCBs.

**Comparaison avec l'étude de Jonas margot** L'étude de Jonas montrait 2 fois plus de PCBs dans le site de référence et une concentration relativement proche ( -12%) pour le site 2.

L'étude des empreintes montre des différences significatives si on compare le site 2 de la présente étude avec celui de Jonas (p-valeur = 1,5e-31) et avec le site de référence

de Jonas ( $p$ -valeur =  $2,1e-32$ ). Cela peut indiquer soit que les sources de PCBs soient différentes entre 2008 et 2009, soit qu'au contraire des HAPS, les apports ne soient pas aussi régulier dans le temps et que l'empreinte est influencé par des phénomènes de dégradation ou de transport différencié selon les congénères.

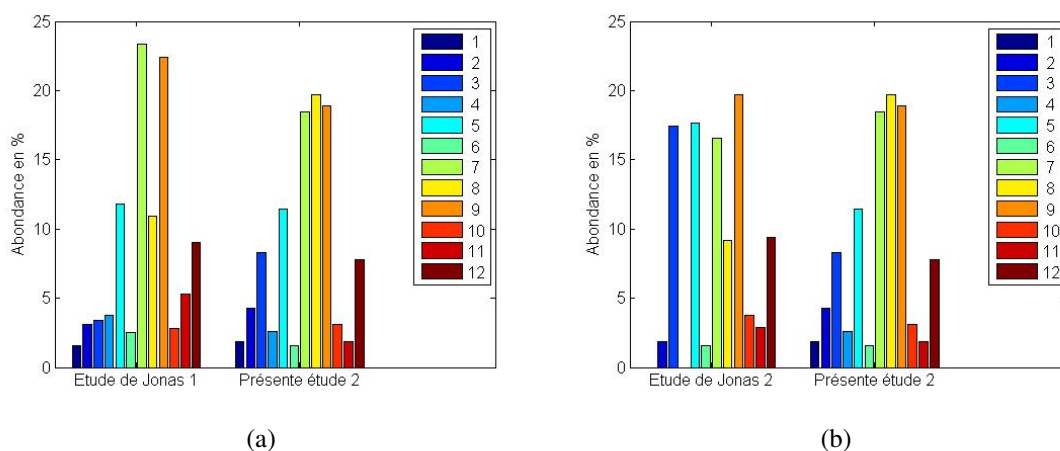


FIGURE 13: Comparaison des empreintes PCBs entre la présente étude et celle de Jonas Margot

**Conclusion des analyses de PCBs** Même si la concentration totale de PCBs n'est pas au-dessus de la valeur de PEC, ce site est très pollué à l'échelle suisse. Pour dériver ces valeurs de PEC et TEC, MacDonald et al.[35] ont utilisés d'autres publications[37]. La manière dont ces publications définissent les PCBs totaux varient et peuvent être par exemple basés sur les congénères du produit Aroclor® commercialisé par Monsanto. Il a depuis été mis en évidence que les congénères coplanaires des PCBs (douze répertoriés plus toxiques par l'association mondiale de la santé WHO, 1998) avaient une structure et une toxicité comparable aux dioxines (en anglais on parle de PCBs "dioxine-like"). Comme les PCBs sont les plus toxiques, les prochaines recommandations sur la qualité des sédiments devraient être plus basés sur leurs concentrations.

### 3.5.8 Conclusion pour les analyses de polluants et intégration à l'approche par faisceau de preuve

Même si les concentrations mesurées étaient toujours sous la valeur de TEC, Le site 1 est aussi relativement pollué par les trois classes de polluants mesurés (métaux lourds, HAPs et PCBs). C'est donc un mauvais site de référence.

Le site 2 montre des concentrations élevées pour les trois classes de polluants et même si les PECs ne sont pas atteintes, une toxicité sur l'écosystème benthique est possible, par exemple avec l'effet des mélanges. Le risque lié à la bioaccumulation et à la bioamplification n'a pas été estimé mais pourrait être important en raison de la présence de ces trois classes de polluants persistants au fort potentiel.

Dans le cadre de l'approche par faisceau de preuves, la présence de concentrations de polluants situé entre les valeurs de TECs et PECs n'indique pas de toxicité avec certitude et mérite donc une confirmation. Pour cela l'utilisation de l'indice biologique semble approprié pour déterminer si il y a une dégradation des communautés benthiques.

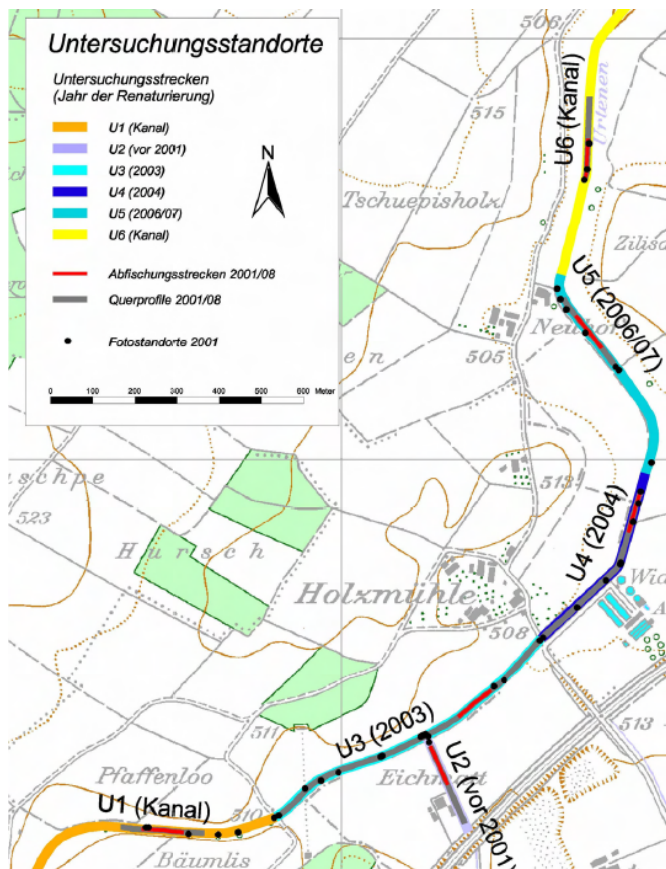


FIGURE 14: Plan des sites d'échantillonnages pour la détermination des indices biologiques

### 3.6 Résultat de l'indice biologique

Idéalement, l'indice biologique doit être calculé sur plusieurs sites, dont un sert de référence non toxique. Dans le cadre de cette étude, il n'a pas été possible de conduire une campagne pour produire un indice propre à notre site. Il a donc été décidé d'utiliser une étude rendu en 2009 pour le suivi d'un projet de renaturation de la rivière Urtenen[25]. Comme cette étude a été conduite plus en aval de nos stations d'échantillonnage, les résultats doivent permettre de déterminer l'état général de l'Urtenen.

#### 3.6.1 Méthode et choix des sites d'échantillonnages

Pour cette étude, six sites avaient été choisis. Tous sont à l'aval du village de Mattstetten et proche de celui de Holzühle (voir figure 14). Dans le sens du courant, le premier est canalisé, les quatre suivants ont été renaturés entre 2001 et 2007 et le dernier est

aussi canalisé. A noter aussi qu'il y a une station d'épuration d'une capacité de 50000 Equivalent-Habitant au niveau de la quatrième section. Comme notre site 2 situé à l'aval du déversoir de Bad est aussi canalisé et pour éviter l'influence de la station d'épuration, le premier site d'échantillonnage (U1 : notée site canalisé ici, voir figure 15a) sera utilisé comme indicateur de l'état de la rivière.

L'utilisation de cet indice biologique se fait donc sous la double hypothèse : que l'habitat de notre site et du site canalisé sont les mêmes car les deux sont canalisés et que le site canalisé subit l'effet du déversoir de Bad et est représentatif du tronçon de l'Urtenen qui nous intéresse.

Bien sûr, utiliser un seul point d'échantillonnage éloigné de près de 3km n'est pas optimal car on ne connaît pas à priori quel est l'influence du déversoir de Bad sur la rivière Urtenen. On peut aussi utiliser le site renaturé en 2003 (notée U3 dans le rapport mais que l'on appellera site renaturé, voir figure 16 et figure 15b) et qui se trouve directement en aval du site canalisé pour comparer l'influence de l'amélioration des caractéristiques morphologiques.

Idéalement, un indice IGBN devrait toujours être interprété en comparaison d'un site de référence propre pour pouvoir prouver la causalité entre la dégradation de l'indice benthique et la pollution mesurée. Cela n'avait pas été le cas ici car c'est l'influence de la renaturation qui était étudié.



(a) Site U1 : le 2.10.2001



(b) Site U3 le 13.03.2009 après renaturation

FIGURE 15: Tronçons U1 et U3

### 3.6.2 Résultat et discussion

Tout d'abord, on observe que la qualité écologique s'est détériorée pour les deux sites (U1 et U3) entre 2001 et 2008, cette baisse à la fois de l'IGBN et du GI est due à la disparition des *Goeridae* qui sont l'indicateur d'une bonne diversité et sensibilité.

On observe aussi que les valeurs sont toujours plus petites pour le site canalisé que le site renaturé après l'intervention en 2003. On peut donc penser que les différences observées sont dues à une amélioration des habitats. Toutefois, l'amélioration de l'habitat ne permet pas d'avoir un très bon indice biologique pour autant.



FIGURE 16: Site U3 le 2.10.2001 avant renaturation

	Date	IBGN	GI
Site canalisé	Automne 2001	12	7
	Printemps 2008	7	3
	Automne 2008	7	3
Site renaturé	Automne 2001	13	7
	Printemps 2008	9	4
	Automne 2008	10	5

TABLE 17: IBGN calculés pour les sites canalisés en renaturés en 2003 près du village de Holzmühle

Pour l'année 2008 et pour les deux sites, les valeurs d'IBGN sont relativement faibles (<12). Les valeurs de GI basses indiquent qu'il manque les taxons les plus sensibles, notamment à cause de mauvaise qualité des eaux et/ou des sédiments.

En vue des ces résultats, on peut donc classer l'Urtenen comme ayant plutôt une mauvaise qualité biologique avec une biodiversité assez faible et caractérisé par l'absence des taxons les plus sensibles.

En comparant les sites canalisés et renaturés, on observe que la mauvaise qualité morphologiques a une influence mais n'est pas la seule responsable de la dégradation des communautés benthiques. Aussi, la qualité de l'eau à l'exutoire du lac Moossee (voir figure 17a) est moins bonne que le tronçon à l'amont de la station d'épuration (site canalisé) de Holzmühle ( voir figure 17b). On peut donc aussi dire que si une dégradation des communautés benthique doit avoir lieu à cause des mauvaises qualités de l'eau, elle serait probablement plus importante à l'exutoire du lac Moossee, à notre lieu d'étude.

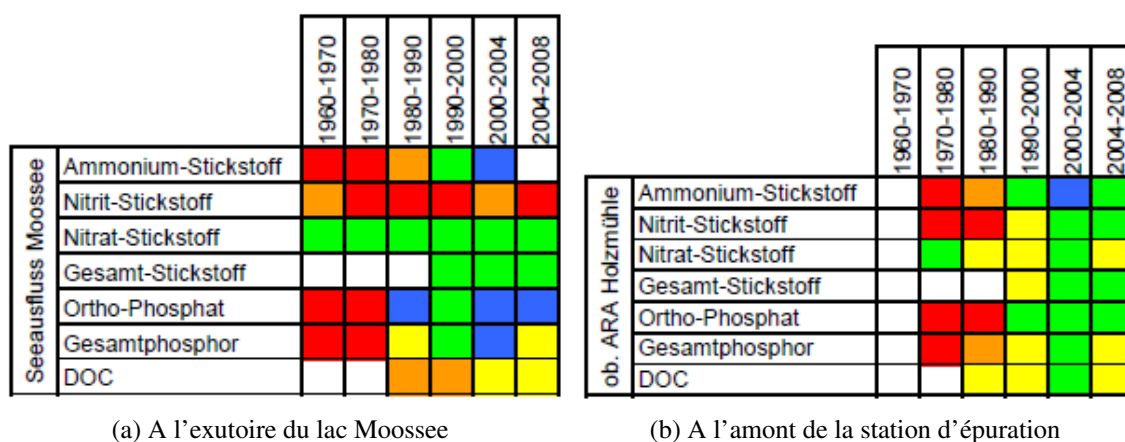


FIGURE 17: Qualité des eaux de l'Urtenen en 1960 et 2008[2]

### 3.6.3 Conclusion pour l'indice biologique et intégration à l'approche par faisceau de preuve

L'indice biologique n'a pas été appliqué de la manière la plus adéquate mais donne toutefois des renseignements importants sur la toxicité de la rivière Urtenen. Il montre que la qualité biologique est relativement mauvaise et s'est même dégradée entre 2001 et 2008. En raison de l'éloignement des stations avec notre situation, la causalité de cette dégradation avec la présence du déversoir de Bad et de l'autoroute reste toutefois incertaine. Il serait donc utile de déterminer des indices benthiques directement en aval du déversoir et de l'autoroute pour confirmer cette hypothèse.

Par rapport à l'approche par faisceau de preuve, où l'intérêt était justement de vérifier l'hypothèse d'une dégradation et de la causalité avec les polluants mesurés, le résultat ne peut être considéré comme une preuve significative (un résultat positif dans le tableau de contingence 1 de la page 17). Il fournit par contre un indice fort sur la dégradation de notre site d'étude et le possible lien avec la pollution observée.

### 3.7 Résultats des tests écotoxicologiques

Les tests écotoxicologiques ont eu lieu à Couvet (NE) dans le laboratoire de l'entreprise Soluval, avec l'aide de Serge Santiago. Une batterie de six bioessais y a été effectuée en mode screening. Le but n'est donc pas de déterminer une EC50 à tout prix mais d'avoir une gamme de concentration suffisamment large pour caractériser le degré de toxicité et la sensibilité de chaque test.

#### 3.7.1 Caractéristiques physico-chimiques des échantillons

Pour que les bioessais soient valides, certaines caractéristiques physico-chimiques sont mesurées au début et/ou à la fin des expériences pour s'assurer que les conditions permettant la survie des espèces de référence durant la durée des tests soient réunies. Et aussi pour que leurs comparaisons avec d'autres essais faits selon les mêmes protocoles soient possibles, voir les tableaux 18, 32 et 33.

Echantillon	Température en °C	pH	Oxygène dissoud en mg/l	Eh en $\mu\text{S}/\text{cm}$
Extrait aqueux 1	19,2	7,18	7,40	187
Extrait aqueux 2	18,2	7,22	6,97	178
Eau de porosité 1	18,1	6,73	6,92	548
Eau de porosité 2	17,6	8,0	6,78	6,20

TABLE 18: Mesures des paramètres physico-chimiques des échantillons

#### 3.7.2 Bioessais Microtox® sur *Vibrio fischeri*

Les bioessais Microtox® sur *Vibrio fischeri* ont été conduits selon les procédures fournis par Azur environnement® (Microtox® Acute toxicity basic test procedure) et adaptés par Serge Santiago.

**Eau de porosité** Les tests sur les deux eaux de porosité donnent des valeurs qui ne permettent pas de calculer des  $IC_{50}$  (concentration d'inhibition de 50% de la luminescence). En effet, l'eau de porosité 1 est stimulante pour toutes les dilutions et l'eau de porosité 2 est stimulante pour les plus petites dilutions et inhibitrice pour les dilutions de 66,6% et 83,3% avec respectivement 7% et 13% de réduction de luminescence après 30 minutes. L'eau de porosité 2 est tout de même significativement plus toxique (p-valeur = 0,0001 par un test ANOVA).



**Extrait aqueux** De la même manière que pour l'eau de porosité, l'extrait aqueux est stimulant pour l'échantillon 1 et ne permet donc pas de calculer de concentrations d'inhibition caractéristique. Pour l'échantillon 2, on observe une toxicité à partir de la dilution à 50% mais elle est toujours inférieure à 5% d'effet inhibiteur (pour la dilution 83%) ce qui ne permet pas non plus de calculer d' $IC_{50}$ . Aussi, l'échantillon 2 est significativement plus toxique (p-valeur = 0,0004).

**Extrait organique** Tout d'abord, le blanc au DMSO (diméthyl sulfoxide) permet de calculer une  $IC_{50}$  à 30 minutes de 1.6%, ce qui est respectivement 31 fois et 51 fois moins toxique que celles calculées pour les échantillons 1 et 2 après 30 minutes. On valide donc les valeurs des extraits 1 et 2 comme étant indépendantes du solvant utilisé dans nos concentrations d'essais.

Les valeurs  $IC_{50}$  calculées après 15 et 30 minutes sont inscrites dans les tableaux 20 et 21.

Après 15 minutes, un test de variance donne une p-valeur :  $0 < 0.005$ , l'extrait 2 est donc significativement plus toxique que l'extrait 1.

Après 30 minutes, un test de variance donne une p-valeur :  $0.002 < 0.005$ , l'extrait 2 est aussi significativement plus toxique que l'extrait 1.

Enfin, La toxicité diminue entre 15 et 30 minutes de manière significative pour les deux échantillons (p-valeur = 0,003 pour l'échantillon 1 et p-valeur = 0 pour l'échantillon 2), mais pas pour le blanc au DMSO (p-valeur = 1,476) où elle reste stable.

Durée d'exposition	$IC_{50}$ et [intervalle de confiance à 95%]	Unité Toxique ( $UT_{50}$ ) et [intervalle de confiance à 95%]
15 minutes	0,76% [0,48 ; 1,18]	131,67 [84,59 ; 204,97]
30 minutes	1.62% [0,53 ; 5,01]	61.46 [19,97 ; 189,23]

TABLE 19: Résultats du test Microtox® sur l'échantillon témoin du DMSO

Echantillon	$IC_{50}$ et [intervalle de confiance à 95%]	Unité Toxique ( $UT_{50}$ ) et [intervalle de confiance à 95%]
1 : Lac Moossee	0,0367% [0,0263 ; 0,0512]	2726,4 [1954,05 ; 3804,16]
2 : Rivière Urtenen	0,0174% [0,0112 ; 0,0269]	5756,25 [3717,76 ; 8912,48]

TABLE 20: Résultats des tests Microtox® sur les extraits organiques après 15 minutes



Echantillon	$IC_{50}$ et [intervalle de confiance à 95%]	Unité Toxique ( $UT_{50}$ ) et [intervalle de confiance à 95%]
1 : Lac Moossee	0,0527% [0,0322 ; 0,0862]	1898,88 [1160,05 ; 3108,26]
2 : Rivière Urtenen	0,0317% [0,0242 ; 0,0414]	3155,27 [2413,17 ; 4125,58]

TABLE 21: Résultats des tests Microtox® sur les extraits organiques après 30 minutes

**Sédiment entier** Ce test a été conduit deux fois de la même manière mais a donné des résultats très différents. Les résultats obtenues ne seront donc ni exposés ni discutés ici. Ce test semble donc difficile à appliquer car la reproductibilité n'est pas assurée.

**Conclusion sur les tests Microtox®** Les bioessais Microtox® sur les eaux de porosité et les extraits aqueux ne permettent pas d'observer une toxicité suffisante pour calculer une concentration d'effet. Ils montrent par contre que l'échantillon 2 est plus toxique. Les tests sur les deux extraits permettent de calculer des  $IC_{50}$  et sont donc plus toxique, et l'échantillon 2 est plus toxique que le 1.

### 3.7.3 Bioessais sur *Daphnia magna*

**Eaux de porosité** Avec les sédiments 1 et 2 à 100%, aucun effet n'est observé (0/20 immobilisation après 48 heures).

**Extraits aqueux** Avec les sédiments 1 et 2 à 100%, aucun effet n'est observé (0/20 immobilisation après 48 heures).

**Extraits organiques** Le Blanc au DMSO est sans effet à 8‰ et 6‰ après 48 heures. Pour l'extrait du sédiment 1, aucun effet n'est observé à 8‰. Alors que pour le sédiment 2, on trouve une  $CE_{50}$  de 2,09‰ dans un intervalle de confiance à 95% compris entre 1,78‰ et 2,47‰.

**Conclusion des bioessais sur *Daphnia magna*** L'eau de porosité et l'extrait aqueux ne permettent pas d'observer un effet toxique aiguë sur les daphnies et de différencier les deux sites. Par contre, avec les extraits organiques dans le DMSO, le site 1 ne donne pas d'effet observable à 8‰ alors que le site 2 permet de calculer une  $CE_{50}$ , montrant donc un effet toxique plus important.

### 3.7.4 Bioessais sur *Brachionus calyciflorus*

Les test sur les rotifères ont été fait en deux séries : tout d'abord sur les eaux de porosité et les extraits aqueux puis sur les extraits organiques. les résultats sont reportés dans le tableau 23.

	Echantillon	$IC_{50}$ et [int. de conf. à 95%]	Unité Toxique ( $UT_{50}$ ) et [int. de conf. à 95%]
Eaux de porosité	1 : à 100%	pas d'effet toxique	-
	2 : à 100%	pas d'effet toxique	-
Extraits aqueux	1 : à 100%	pas d'effet toxique	-
	2 : à 100%	pas d'effet toxique	-
Extraits organiques	témoin DMSO à 8‰	pas d'effet toxique	-
	1 : à 8‰	pas d'effet toxique	-
	2 :	2,09‰ [1,78 ; 2,47]	478,47 [404,86 ; 561,8]

TABLE 22: Résultats des bioessais sur *Daphnia magna***Critères de validité pour les tests sur l'eau de porosité et extraits aqueux**

Les critères de validité du test sont tous atteints : il y a 100% de reproductrice dans le contrôle (6/6 quand le critère est de 85%) et la reproduction moyenne est de 7,33 juvénile par puits (le critère est de 3).

**Eaux de porosité** Pour le sédiment 1 : les deux dilutions de 90% et 60% sont autour de la  $CE_{50}$ , avec respectivement 56,8% et 43,1% d'inhibition de la reproduction. Un test de variance ANOVA donne que les résultats des deux dilutions ne sont pas significativement différents (la p-valeur calculée de 0,1399 est largement supérieure à un  $\alpha$  de 0,05). On calcule une  $CE_{50}$  de 73,45% dans un intervalle de confiance à 95% compris entre 55,28% et 97,74%.

Pour le sédiment 2, on n'utilise pas la valeur à 40% de dilution, qui est stimulante (+ 22,7% de juvéniles), pour pouvoir calculer une  $CE_{50}$ . On obtient une  $CE_{50}$  pour une dilution de 85% dans un intervalle de confiance compris entre 54,3% et 135,2%.

Enfin, on trouve que les résultats pour les deux sites ne sont pas significativement différents (la p-valeur de 0,438 est beaucoup plus grande que 0,05).

**Extraits aqueux** Pour les extraits aqueux, il n'y a pas assez de données pour calculer des  $EC_{50}$ . Pour une dilution de 90%, on observe une inhibition de la reproduction des rotifères de 54,5% pour le site 1. Pour le site 2, on trouve des inhibitions respectivement de 29,54% et de 40,91% pour les dilutions 90% et 60%. Toutefois cette différence n'est pas significative au sens du test de variance ANOVA (la p-valeur vaut 0,425 > 0,05). Pour la dilution 90%, le site 1 n'est pas significativement plus toxique que le site 2 (la p-valeur vaut 0,049 ce qui est trop proche du  $\alpha$  (=0,05) pour pouvoir dire que la différence entre les deux est significative).

	Echantillon	$IC_{50}$ et [int. de conf. à 95%]	Unité Toxique ( $UT_{50}$ ) et [int. de conf. à 95%]
Eaux de porosité	1 :	73,45% [55,28 ; 97,74]	1,36 [1,02 ; 1,81]
	2 :	85% [54,3 ; 135,2]	1,18 [0,74 ; 1,84]
Extraits aqueux	1 : à 90%	seulement 54,5% d'effet	-
	2 : à 90%	seulement 29,54% d'effet	-
Extraits organiques	témoin DMSO à 2‰	pas d'effet toxique	- -
	1 :	2,7‰ [0,28 ; 25,9]	370,37 [38,61 ; 3571,43]
	2 :	0,61‰ [0,32 ; 1,13]	1639,34 [884,95 ; 3125,95]

TABLE 23: Résultats des bioessais sur *Brachionus calyciflorus*

**Extraits organiques** Pour les tests sur les extraits organiques, le critère de validité du contrôle n'est pas atteint. En effet, il n'y a pas assez de mères reproductrices : seulement 4/6, soit 66,6% ce qui est inférieur au critère de validité requis de 85,5%. Les deux puits problématiques comportent respectivement un seul et aucun individu : il doit s'agir d'un mâle et d'un individu mort ou non-introduit au début du test à cause d'une mauvaise manipulation. Ces résultats ne devraient donc pas être utilisés pour le reste de l'étude.

Pour les échantillons témoins (blanc) au diméthyl sulfoxyde (DMSO), on n'observe pas d'effet pour l'échantillon à 2‰ mais une inhibition de 16.66% pour l'échantillon à 1‰ de DMSO. Toutefois, la p-valeur calculée est de  $0,249 > 0,05$  donc la différence entre les deux blancs n'est pas significative. Aussi, les deux échantillon blancs ne sont pas significativement différents du contrôle (p-valeur =  $0,391 > 0,05$ ) ce qui valide l'utilisation du DMSO comme solvant dans les concentrations retenues.

Pour l'extrait organique du site 1, on calcule une  $CE_{50}$  de 2.7‰, mais il est contenu dans un très grand intervalle de confiance (entre 0.28‰ et 25.9‰) causé par la très grande variabilité des valeurs pour la dilution 1‰.

Pour l'extrait organique du site 2, on calcule une  $CE_{50}$  de 0.61‰ dans un intervalle de confiance compris entre 0.32‰ et 1.13‰.

Un test de variance anova nous donne une p-valeur  $0,0306 < 0,05$  donc l'extrait 2 est significativement plus toxique que l'extrait 1.

**Conclusion des bioessais sur les rotifères** Le test rotifère est assez sensible et permettrait de calculer des  $CE_{50}$  pour plusieurs types d'extraits. Il indique un effet plus toxique pour l'extrait organique 2 que pour l'extrait 1. L'eau de porosité ne différencie pas les 2 sites. L'extrait aqueux a été utilisé avec moins de dilutions différentes et la

grande déviation des résultats semble montrer qu'il n'y a pas de différence significative. Comme les critères de validité requis n'ont pas été atteints pour les extraits organiques, leurs résultats ne sont pas utilisés pour la suite.

### 3.7.5 Bioessais sur *Ceriodaphnia dubia*

**Contrôle et validité** Les critères de validité sont : 6 mères sur 10 doivent avoir eu au moins 3 portées durant la durée de l'expérience, chaque mère doit avoir eu en moyenne 15 juvéniles. Après 8 jours, les 2 critères sont respectés : toutes les mères ont eu au moins 3 portées et le nombre moyen de juvénile par mère est de 20,9.

**Eaux de porosité** Il y a une stimulation de la reproduction pour toutes les concentrations et les deux sites différents, voir le tableau 24.

**Extraits aqueux** De même, il y a une stimulation de la reproduction pour les deux extraits aqueux.

**Extraits organique** Le blanc au DMSO a un effet stimulant de -11,4% par rapport au contrôle.

L'extrait 2 a un effet stimulant alors que l'extrait 1 a un effet inhibiteur : 7,7% d'inhibition de la reproduction pour les deux concentrations. mais la différence n'est pas significative entre les deux extraits (p-valeur = 0,334).

**Conclusions des bioessais sur *Ceriodaphnia magna*** Pour quasiment tous les tests, la stimulation est plus importante que l'inhibition. L'explication principale vient sûrement des nutriments contenus dans les différents extraits qui stimulent les organismes.

### 3.7.6 Bioessais sur *Pseudokirchneriella subcapitata*

Cet essai a été uniquement conduit sur les extraits organiques. En effet ce test est très sensible à la présence de nutriment dans l'échantillon d'essai et il a paru moins pertinent de le faire avec les eaux de porosité et extraits aqueux.

**Extraits organiques** Graphpad prism® n'a pas permis de calculer des concentrations d'effet caractéristiques, on a alors utilisé la macro REGTOX. Comme aucun des effets toxiques ne dépasse 20% d'inhibition de la croissance, l'effet à 10% est le meilleur pour comparer les deux extraits organiques. Les résultats sont donnés dans le tableau 25. Le test de variance anova dit qu'il n'y a pas de différence significative de toxicité entre les deux extraits sur les algues (p-valeur = 0,149 > 0,05).

### 3.7.7 Bioessais sur *Lemna minor*

Le test sur les lentilles d'eau a été conduit seulement sur les eaux de porosité et les extraits aqueux.

Echantillon	Concentration	Pourcentage d'inhibition par rapport au contrôle
Extrait aqueux 1	90%	-28,89%
Extrait aqueux 2	90%	-52,17%
Eau de porosité 1	90%	-19,56%
	60%	-34,87%
Eau de porosité 2	90%	-49,69%
	60%	-28,65%
	45%	-50,65%
blanc au DMSO	0,1‰	-11,43%
Extrait organique 1	0,03‰	7,69%
	0,1‰	7,69%
Extrait organique 2	0,03‰	-4,5%
	0,1‰	-3,91%

TABLE 24: Résultats des bioessais sur *Ceriodaphnia dubia*

Echantillon	$CE_{10}$ et [intervalle de confiance à 95%]	$UT_{10}$ et [intervalle de confiance à 95%]
1 :	0,273% [0,084 ; 0,832]	366,3 [120,19 ; 1190,48]
2 :	0,312% [0,177 ; 0,434]	320,51 [230,41 ; 564,97]

TABLE 25: Résultats du test des extraits organiques sur les algues vertes

**Eaux de porosité** Comme les effets ne vont pas au dessus de 30%, On peut seulement calculer des  $EC_{25}$  avec un intervalle de confiance satisfaisant. On trouve donc des valeurs de 71,54% et 74,83% (voir le tableau 26 pour les intervalles de confiance). Ces résultats ne sont pas significativement différents ( $p$ -valeur = 0,348 > 0,05).

**Extraits aqueux** Ce test n'a été fait qu'avec une seule concentration (100% d'échantillon). Le résultat ne peut donc être interprété que comme un ordre de grandeur de toxicité. On obtient 35% d'inhibition de croissance pour le site 1 et 20% pour le site 2. Il n'est pas possible de comparer les deux échantillons comme il n'y a pas de réplicas.

**Conclusions des bioessais sur *Lemna minor*** Sur les deux extraits testés, le test avec *Lemna minor* ne permet pas de calculer des  $EC_{50}$  mais montre tout de même une certaine sensibilité. Par contre il ne permet pas de différencier les deux sites.

	Echantillon	$CE_{25}$ et [int. de conf. à 95%]	$UT_{25}$ et [int. de conf. à 95%]
Eaux de porosité	1 :	71,54% [40,05 ; 91,7]	1,40 [1,09 ; 2,50]
	2 :	74,83% [27,46 ; 105,05]	1,33 [0,95 ; 3,64]
Extraits aqueux	1 : à 100%	seulement 35,11% d'effet	- -
	2 : à 100%	seulement 20,88% d'effet	- -

TABLE 26: Résultats du test des eaux de porosité sur les *Lemna minor*

### 3.7.8 Comparaison de la toxicité entre les deux sites

Les trois extraits avec Microtox®, les extraits organiques avec *Daphnia magna* et avec *Brachionus calyciflorus*, soit cinq tests, montrent que le site 2 est plus toxique que le site 1. Ainsi, le test avec Microtox® et les extraits organiques dit que le site 2 est 1,7 fois plus toxique que le site 1 et 4,3 fois plus toxique avec le test sur *brachionus calyciflorus*. Pour le bioessai avec *Daphnia magna*, le site 2 est plus de 2 fois plus toxique que le site 1 (comme aucune toxicité n'a été mesurée pour le site 1, on se base sur la plus grande concentration sans effet observable, de 4‰).

Les tests suivants montrent une toxicité mais ne permettent pas de différencier les deux sites : les eaux de porosité et les extraits aqueux avec *Brachionus calyciflorus* et *Lemna minor*, les extraits aqueux avec *Ceriodaphnia dubia* et algues vertes.

Les autres tests ne donnent pas de réponses toxiques : les eaux de porosité et les extraits aqueux avec *Daphnia magna* et *Ceriodaphnia dubia*.

En conclusion, pour les eaux interstitielles, seul le test Microtox® montre que le site 2 est légèrement plus toxique que le site 1, mais les deux sites restent peu toxiques (aucun effet supérieur à 13% n'a été observé). Pour les extraits aqueux, il y a aussi peu de différences entre les deux sites avec le test Microtox® qui est le seul à réagir, montrant que la situation de remise en suspension de sédiment entraînerait peu de risque toxique. Pour les extraits organiques, on observe une toxicité plus importante pour le site 2 pour trois bioessais différents (même si le test avec *Brachionus calyciflorus* n'a pas été validé). Le site 2 a donc un potentiel toxique plus important que le site 1. Ainsi, par comparaison avec les résultats de l'eau de porosité, on voit que les polluants bien que présents et potentiellement toxiques, sont peu biodisponibles. Des bioessais sur des espèces benthiques en contact direct avec les sédiments amèneraient ici une information importante sur la biodisponibilité des polluants.

### 3.7.9 Comparaison avec les résultats obtenues par Jonas Margot

Les résultats obtenus par Jonas Margot[38] sont exprimés en gramme d'équivalent sédiments sec par litre (g eq-sed/l). Il convient donc de convertir les résultats obtenus ici selon la formule 6 pour pouvoir les comparer.

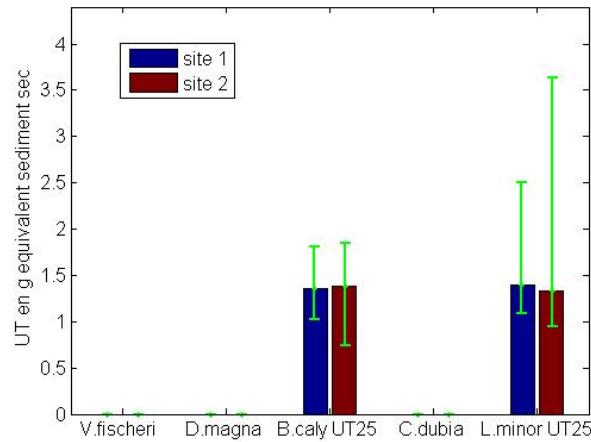


FIGURE 18: Résultats des bioessais conduit avec les eaux de porosité et exprimés en unité toxique

$$C_s[g \text{ eq.sed}/l] = \frac{C_0[\%]}{100} \times \frac{M[g]}{V[l]} \quad (6)$$

On compare d'abord son site de référence et celui choisi pour la présente étude (et nommé site 1) pour vérifier si la rive droite du lac Moossee est moins contaminée que la gauche comme nous l'avons supposé lors de son choix pour l'échantillonnage. Puis on compare les sédiments du site 2, à l'aval à la fois du déversoir d'orage et de l'auto-route. Comme les procédures d'échantillonnages et de test sont relativement similaires, la comparaison entre les résultats est possible et permet de voir l'état de la toxicité après un an et demi.

**Comparaison entre les deux sites de référence** Pendant l'étude de Jonas Margot, le site de référence choisi sur la rive gauche du lac Moossee n'avait pas réagit avec l'eau interstitielle sur les bioessais Microtox® et *Daphnia magna*. Les bioessais ayant montrés des effets observables sont incrit dans le tableau 27 avec l'effet correspondant en gramme d'équivalent sédiment sec quand une  $EC_{50}$  a pu être calculée ou le pourcentage d'effet toxique observé avec la concentration de la dilution d'essai.

Ainsi, le test Microtox® à 15 minutes montre une plus grande toxicité pour notre site de référence choisi sur la rive droite qui est 2,6 fois plus toxique que celui de Jonas. Le test sur *Brachionus calyciflorus* montre un ordre de grandeur proche, autour d'une  $CE_{50}$  pour l'eau de porosité à 100% mais ne permet pas de comparer les deux car il n'a pas assez de dilutions d'essais différentes et à cause de la grande variabilité dans les répliques. Le test avec *Daphnia magna* ne montre pas de réponse pour notre site mais un très léger effet pour celui de Jonas margot avec 15% d'immobilisation.

En conclusion, on peut dire que les deux sites montrent une toxicité dans un même rang de toxicité. Le résultat sur le test Microtox® indique même que notre site de référence est légèrement plus toxique.

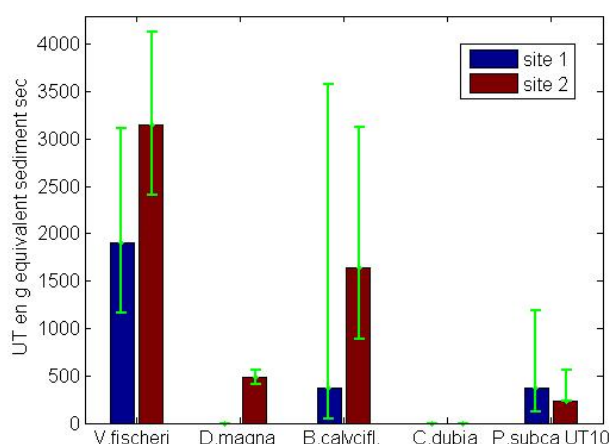


FIGURE 19: Résultats des bioessais conduit avec les extraits organiques et exprimés en unité toxique

**Comparaison pour le site pollué à l'aval du lac Moossee** Le test avec Microtox® sur l'eau interstitielle n'a pas donné d'effet observable pour l'étude de Jonas. Les test sur *Brachionus calyciflorus* sont de 50% d'effet pour l'étude de Jonas et de 29,54% dans la présente. L'insuffisance des données fait qu'ils ne peuvent pas être comparés mais l'ordre de grandeur toxique est le même. Le test *Daphnia magna* sur les eaux de porosité montre une légère toxicité dans l'étude de Jonas mais pas dans la notre.

Les tests Microtox® et *Daphnia magna* sur les extraits organiques ont permis de calculer des  $EC_{50}$ . les résultats en gramme d'équivalent-sédiment par litre calculés à partir des  $EC_{50}$  sont dans le tableau comp-jonas-site2. La réponse toxique est très différente pour les deux tests. Ainsi, Jonas Margot obtient une réponse plus élevée pour le test Microtox®, qui est 2 fois plus toxique. Alors qu'avec *Daphnia magna*, il obtient une réponse 3 fois moins toxique que pour la présente étude. Comme les deux études répondent de manière contradictoires, il n'est pas possible de distinguer une situation plus toxique que l'autre. Cet exemple illustre aussi l'intérêt d'utiliser une batterie de bioessais pour avoir une réponse plus riche.



Bioessai	Extrait	Présente étude en g eq-sed/l [int. de conf. à 95%]	Etude de Jonas en g eq-sed/l [int. de conf. à 95%]
Microtox® à 15 minutes	extrait organique	1,77 [1,27 ; 2,47]	3,13 [2,89 ; 3,38]
<i>Brachionus calyciflorus</i>	eau de porosité à 100%	54,5% d'effet toxique	36% d'effet toxique
<i>Daphnia magna</i> à 48 heures	extrait organique à 0,8‰	pas d'effet	15% d'effet

TABLE 27: Comparaison des résultats des bioessais avec ceux de Jonas Margot pour le site de référence (site 1)

Bioessai	Extrait	Présente étude en g eq-sed/l [int. de conf. à 95%]	Etude de Jonas en g eq-sed/l [int. de conf. à 95%]
Microtox® à 15 minutes	extrait organique	8,14 [5,23 ; 12,58]	2,32 [2,02 ; 2,66]
<i>Daphnia magna</i> à 48 heures	extrait organique	9,78 [7,86 ; 11,55]	21,3 [18,2 ; 23,9]
<i>Daphnia magna</i> à 48 heures	eau de porosité à 100%	pas d'effet	16% d'effet toxique
<i>Brachionus calyciflorus</i>	eau de porosité à 100%	29,54% d'effet toxique	50% d'effet toxique

TABLE 28: Comparaison des résultats des bioessais avec ceux de Jonas Margot pour le site 2

### 3.7.10 Application de l'indice SED-TOX

Pour calculer l'indice SED-TOX, on utilise la méthode développée par Environnement Canada et décrite à l'annexe 6.12 à la page 85.

**Indice SED-TOX tel que décrit dans la littérature** En appliquant strictement la méthode proposée par Manon Bombardier, et en utilisant les résultats de bioessais ayant permis de calculer une  $EC_{10}$ ,  $EC_{25}$  ou  $EC_{50}$ .

On donne au facteur de dilution  $D$  une valeur 1 pour les eaux de porosité et les extraits aqueux. Pour les extraits organiques, on lui donne une valeur calculée selon l'équation 7. Cette équation convertit les  $EC_{50}$  exprimées en % de DMSO, en  $EC_{50}$  exprimées en sédiments humides (centrifugés) équivalent.

$$D = \frac{M_{pf}[g]}{100 \times V_{DMSO}[l]} \quad (7)$$

On obtient finalement des indices SED-TOX de 0,58 pour le site 1 et 0,68 pour le site 2. Dans les deux cas, la valeur se trouve dans la classe de toxicité "sans risque potentiel". Ce résultat est relativement différent de l'interprétation faite précédemment test par tests car il ne semble pas tenir compte du tout des extraits organiques. En effet, l'indice SED-TOX ne différencie pas nos deux échantillons et ne les classe pas comme présentant un risque toxique. Evidement, il faut s'attendre à une perte d'information lors du calcul d'un indice quel qu'il soit, mais ici le résultat est trop différent pour être négligé ou simplement ignoré.

Quels paramètres dans ce calcul font que la différence entre l'interprétation "d'expert" faite sur la base des  $EC_{50}$  calculées et l'indice SED-TOX est si importante ? Comme l'interprétation s'est faite de manière plus précise, elle est considérée comme la référence("juste"), il nous revient donc ensuite de critiquer le choix et l'influence des principaux paramètres de l'indice SED-TOX ?

**Influence du choix des extraits** Les bioessais conduits sur l'extrait aqueux n'ont montrés aucun effet toxique. Ainsi, il ne participent pas à la moyenne des FIT. Par contre le facteur de redondance est 1,75 avec les extraits organique et seulement 1 sans. Les indices SED-TOX recalculés sans les extraits aqueux sont tous deux plus élevés : 0,76 pour le premier site et 0,60 pour le site 2. A cause des valeurs non nulles posées pour les tests sans effet, cela entraîne soit une valeur de FIT autour de 1 mais si elle est inférieure à 1, elle est considérée nulle. Dans tout les cas un indice SED-TOX inférieur à 1 correspond à un sédiment potentiellement non toxique.

**Influence du choix des bioessais** Comme des bioessais pris en compte dans le calcul de l'indice n'ont pas répondu on peut se poser la question de leur influence sur l'indice. S'ils diminuent significativement l'indice, faut-il les considérer comme pas assez sensible et les retirer du calcul pour obtenir un indice plus élevé ? Si l'on recalcule un indice SED-TOX avec seulement les tests ayant répondu (Microtox®, *Brachionus calyciflorus*, *Lemna minor* et *Pseudokirchneriella subcapitata* avec les eaux de porosité et les extraits organiques), on trouve des valeurs de 0,91 pour le site 1 et 0,93 pour le site 2. On voit donc que les valeurs sont quasiment deux fois plus élevées mais sans toutefois changer ni la classe de toxicité ni la différenciation entre les deux tests.

Pour utiliser un indice SED-TOX est semble donc préférable de déterminer une batterie de test type que l'on utilisera avec des bioessais que l'on sait sensible pour une grande variété de polluants.

**Influence du choix des facteurs de sensibilité** Les facteurs de sensibilité ont été choisis de manière arbitraire par un jugement d'expert dans la publication de Bombardier[3]. Il a été fixé à 0,1 sur les extraits organiques pour tenir compte du fait que toute la fraction des polluants organique contenue dans le sédiment devient biodisponible pour les tests alors qu'in-situ, seule une petite partie l'est vraiment. On observe dans nos résultats que ce facteur a un poids important et qu'il réduit l'influence du résultat sur Microtox® alors qu'il montre une différence entre les deux sites (FIT = 7,47 pour le site 1 et 13,10 pour le site 2). Mais si ce facteur a été déterminé de manière arbitraire, c'est que les principes physico-chimiques qui régissent la biodisponibilité des polluants

Site	PCBt	HAPt	Cd	Cr	Cu	Zn	Indice SED-TOX
Site 1	0,004	1,1	-	6,8	22,3	58,1	0,58
Site 2	0,17	10,2	-	33,9	74	320,3	0,68
1-1A	0,05	0,1	0,5	4	8	110	0,65
1-3B	0,05	0,1	0,5	14	27	240	0,69
SH-2	n.d	9,9	3,8	188	2020	748	2,20
2-2A	1,9	26,8	3	82	36	620	2,30
FC-10	n.d	38	2	46,3	139	366	2,37
TEC	0,058	1,6	0,99	43,4	31,6	121	
PEC	0,676	22,8	4,98	111	149	459	

TABLE 29: Comparaison des résultats des analyses chimiques et des indices SED-TOX pour notre étude et celle de Bombardier et al.[4]

et son lien avec la matière organique de la phase solide sont très complexes et ne sont pas parfaitement décrits dans l'état actuel de la technique.

**Influence du calcul du FIT pour les tests quantiques** Le facteur d'incrément toxique *FIT* est calculé différemment pour les tests quantiques ou non-quantiques. Dans notre cas, on observe que le test avec *Daphnia magna* donne un résultat négligeable : un FIT de 0,05 ce qui n'est pas pris en compte dans le calcul de l'indice SED-TOX (car plus petit que 1), et cela bien que l'on puisse mesurer une  $EC_{50}$ .

Si on calcule le FIT de la même manière que pour les test non-quantiques, on obtient un FIT de 3,89 pour le site 2 et un nouvel indice SED-TOX de 0,96 : mais comme on rajoute une valeur pour les extrait organiques, cela diminue la moyenne du test Microtox® et diminue donc l'indice SED-TOX final.

Comme le choix du calcul du FIT n'est pas expliqué dans la publication[3], il est difficile à critiquer ici mais mériterait une discussion.

**Comparaison entre nos valeurs et celles d'une étude faite au Canada** Une hypothèse pour expliquer le faible indice SED-TOX calculé dans notre étude est simplement que nos sites sont peu toxiques par rapports aux situations existantes au Canada.

Pour confirmer cela, on compare les résultats d'une étude de Bombardier et al.[4] avec les notres, voir tableau 29.

On observe ainsi que pour les deux sites : 1-1A et 1-3B, où aucune concentration ne dépasse la PEC, l'indice SED-TOX est inférieur à 1, indiquant qu'il n'y a pas de risque toxique comme pour nos deux sites d'essais.

Pour les sites SH-2, 2-2A et FC-10 au moins une valeur de PEC est dépassée (celles des PCBs, des HAP et du Zn pour 2-2A ; celles du Cr, du CU et du Zn pour SH-2 et celle des HAP pour FC-10). Les trois sites sont une classe au-dessus et sont classés comme présentant un risque marginal.

On voit ainsi que nos sites de recherche, bien que parmi les sites suisses les plus pollués selon l'étude de l'OFEV[45], ne seraient pas considérés comme présentant de risque pour le Canada où il y a des sites beaucoup plus pollués.

**Conclusion sur l'utilisation de l'indice SED-TOX** En vue des résultats observés, il semble donc important pour l'utilisation de l'indice SED-TOX de déterminer une batterie d'essais avec des tests adéquats, à la représentativité et à la sensibilité suffisante. L'absence de différenciation entre nos deux sites semble simplement du au fait que l'échelle de valeur est logarithmique et que nos résultats ne sont pas si différents.

Pour utiliser un indice SED-TOX en Suisse, il faudrait aussi adapter l'échelle de qualité car la Suisse possède vraisemblablement des sites moins pollués.

### 3.7.11 Conclusion des tests écotoxicologiques et intégration dans l'approche par faisceau de preuve

Tout d'abord, on a observé que la présence de nutriments à tendance à stimuler la plupart des tests, rendant l'observation d'un effet toxique difficile.

Les tests Microtox® et *Brachionus calyciflorus* sont ceux qui ont montré le plus de sensibilité à tous les extraits. Toutefois, pour les eaux de porosité et les extraits aqueux, les deux sites semblent peu toxiques et sont tout juste différenciables en défaveur du site 2. Par contre avec les extraits organiques, les essais Microtox® *Daphnia magna* et *Brachionus calyciflorus* ont montré que le site 2 était le plus toxique. Le mélange des polluants présents est donc toxique si il est rendu entièrement biodisponible par l'extraction organique. Mais ces polluants étant peu solubles, ils sont en faibles concentrations dans l'eau de porosité et présentent donc peu de risque pour les espèces pélagiques par la voie de contamination simple par contact avec l'eau du milieu. Par contre, l'effet de la voie de contamination par contact direct avec les sédiments dont le potentiel toxique est démontré, n'a pas été élucidé ici. Cela pourrait se faire par exemple avec des bioessais sur des espèces benthiques comme les amphipodes *Hyallela azteca* ou les *Chironomus riparius*.

Pour l'approche par faisceau de preuves, les bioessais amènent la preuve du potentiel toxique des polluants organiques dans les sédiments. Par contre la preuve de la contamination de ces sédiments ne pourraient se faire que par des tests sur des organismes benthiques avec des essais par contact direct pour mettre en évidence la voie de contamination la plus représentative sur les espèces les plus représentatives.

### 3.8 Conclusion de l'approche par faisceau de preuve

L'apport de chaque voie d'investigation à l'approche par faisceau de preuve a été débattu dans la conclusion de chacune d'entre elles. Nous allons mettre ici en commun ces résultats pour les interpréter ensemble, en s'appuyant sur le tableau de contingence 2 de la page 18.

**Les analyses physico-chimiques** Les analyses physico-chimiques nous ont donc apprises :

1. Que les polluants analysés : les HAPs, les PCBs et quatre des six métaux lourds mesurés (Pb, Ni, Cu, Zn), étaient présent dans des concentrations de l'ordre du ppm.
2. Que les concentrations de polluants mesurés pouvaient avoir un possible effet toxique, par comparaison avec les valeurs de recommandation de TEC et PEC proposés par MacDonald et al.[35].
3. Que d'autres facteurs comme le soufre ou l'ammonium mesurés ne présentaient pas de risque toxiques.

Par contre, ils ne permettent pas de savoir :

1. Si d'autres polluants sont présents comme : d'autres métaux (Hg), des polluants bromés (PBDE), des produits phytosanitaires, des médicaments...
2. Si le risque lié aux polluants analysés était réel.
3. Si les polluants organiques persistants analysés présentent un risque de bioaccumulation et de bioamplification le long de la chaîne trophique.

Ces analyses ont donc permis de confirmer la pollution des sédiments des deux sites, le site 2 étant même plus pollué. Mais elles ne suffisent pas pour confirmer la contamination des sédiments, c'est à dire la dégradation de leurs biocénoses par l'effet des polluants. En cela, l'indice biologique IBGN est complémentaire.

**L'indice biologique** L'indice biologique IBGN nous a appris :

1. Que les communautés benthiques sont dégradées.
2. Que la morphologie canalisée de la rivière n'est pas responsable de toute la dégradation.
3. Que seules des espèces les moins sensibles à la pollution sont présentes et donc qu'il y a probablement une pollution de l'eau ou des sédiments.

Par contre, l'indice biologique IBGN ne permet pas de savoir :

1. Si le lien de causalité entre la pollution et la dégradation est fort.
2. Si l'indice IBGN mesuré est directement transposable à notre station.
3. Si l'effet d'habitat ou d'autres paramètres physiques jouent aussi un rôle.

L'indice biologique IBGN a permis de confirmer la dégradation des communautés benthiques dans la rivière Urtenen. Il fournit aussi un indice sur les causes de cette dégradation : la morphologie canalisée de la rivière et la pollution de ces eaux ou de ces sédiments. Une grande incertitude demeure sur la transposition de ces résultats à notre station qui est 3km en amont.

**Les test écotoxicologiques** Les tests écotoxicologiques nous ont appris :

1. Que les polluants étaient très peu disponibles dans les échantillons aqueux en raison de leur forts caractères hydrophobes.
2. Que le mélange de tous les polluants extractibles dans le solvant organique étaient toxiques.
3. Que les bioessais utilisés ici étaient peu adaptés à tester la biodisponibilité de polluants organiques dans des sédiments.

Les limites de ces tests écotoxicologiques sont :

1. On n'a pas élucidé la toxicité des sédiments par voie de contamination par contact direct.
2. On manque d'échelle de comparaison pour les résultats des bioessais sur sédiments en suisse.

Les tests écotoxicologiques ont donc fournit la preuve du potentiel toxique du mélange des polluants. Par contre, il reste une incertitude sur la réalisation de ce potentiel pour les espèces benthiques en contact direct avec ce mélange.

Par rapport au tableau de contingence 2, on voit donc que nos résultats ne peuvent pas rentrer clairement dans une case car ils sont plus nuancés. Toutefois, toutes les voies d'investigation montrent que la pollution est présente, et que le mélange des polluant est potentiellement toxique. L'incertitude porte donc plutôt sur la réponse réelle à cette pollution au communatés benthiques. L'on se situe donc entre le cas numéro 1 et le cas numéro 6 du tableau de contingence. Pour affiner cette réponse Les trois propositions seraient envisageables et non concourantes :

1. Déterminer un indice benthique sur notre site déchantillonnage pour confirmer l'atteinte aux communautés benthiques.
2. Conduire des bioessais des espèces benthiques par contact direct pour confirmer que le risque du mélange des polluants est réel.
3. Entamer une nouvelles voie d'investigation sur la bioaccumulation des polluants organiques persistants.

## 4 Discussion sur l'approche TRIAD proposée et appliquée

Dans cette section, nous allons discuter le choix de l'approche par faisceau de preuve proposée. Ensuite, nous allons voir comment il est possible dans l'état actuel de la technique de prolonger l'approche TRIAD pour d'autres voies d'investigations et quelles sont les recherches actuelles dans ce domaine. Finalement, nous reviendrons sur la méthode proposée dans la section 2 pour discuter les choix théoriques et pratiques qui ont été retenus pour chaque étape.

### 4.1 Sur le choix de l'approche TRIAD

L'approche par faisceau de preuves est relativement ambitieuse et nécessite des moyens matériels et financiers importants, ainsi qu'une main d'œuvre très qualifiée : tout d'abord pour développer les "recommandations sur la qualité des sédiments"(RQS) et ensuite pour appliquer les batteries d'analyses, de bioessais et les déterminations d'indices biologiques. Plusieurs pays européens, dont la France, l'Italie ou le Royaume Uni ont l'objectif d'avoir une législation basée sur cette approche mais n'ont pas encore une méthode définitive inscrite dans leur loi. Les Etats-Unis font figure de précurseur dans cette approche. Ainsi, le manuel publié par la SETAC (Society of environmental toxicology and chemistry)[58] offre une revue des approches de plusieurs pays et principalement des RQS.

#### 4.1.1 Approche par faisceau de preuve en simultanée ou "par valeur déclencheuse"

Le fait d'utiliser au minimum deux voies d'investigations différentes est nécessaire pour pouvoir calculer un risque : d'abord des analyses chimiques pour confirmer la présence de polluant et puis avec des bioessais pour confirmer un impact toxique. Par contre, il y a plusieurs manières de l'appliquer.

**En simultanée** En Flandre, une approche TRIAD en simultanée a été choisie. Les analyses chimiques ont lieu sur 6 HAPS, 7 PCBs, 8 métaux lourds et de pesticides et sont comparés avec des valeurs de références. Les bioessais ont lieu sur trois espèces (les algues vertes *Pseudokirchneriella subcapitata*, les crustacées *Thamnocephalus platyurus* et les amphipodes *Hyallela azteca*). Pour finir deux indices biologiques sont calculés. Enfin, les résultats de chaque voie d'investigation sont convertis en classe de qualité qui donnent ensuite une classification globale de la qualité des sédiments.

Cette méthode présente l'avantage de fournir des résultats qui permettent d'être facilement comparés entre eux. Ainsi, toute nouvelle étude peut être intégrée très facilement à une base de données nationale. Par contre, l'application de cette méthode relativement complexe peut être freinée par son coût pour des sites où les enjeux environnementaux seraient jugés moindres.

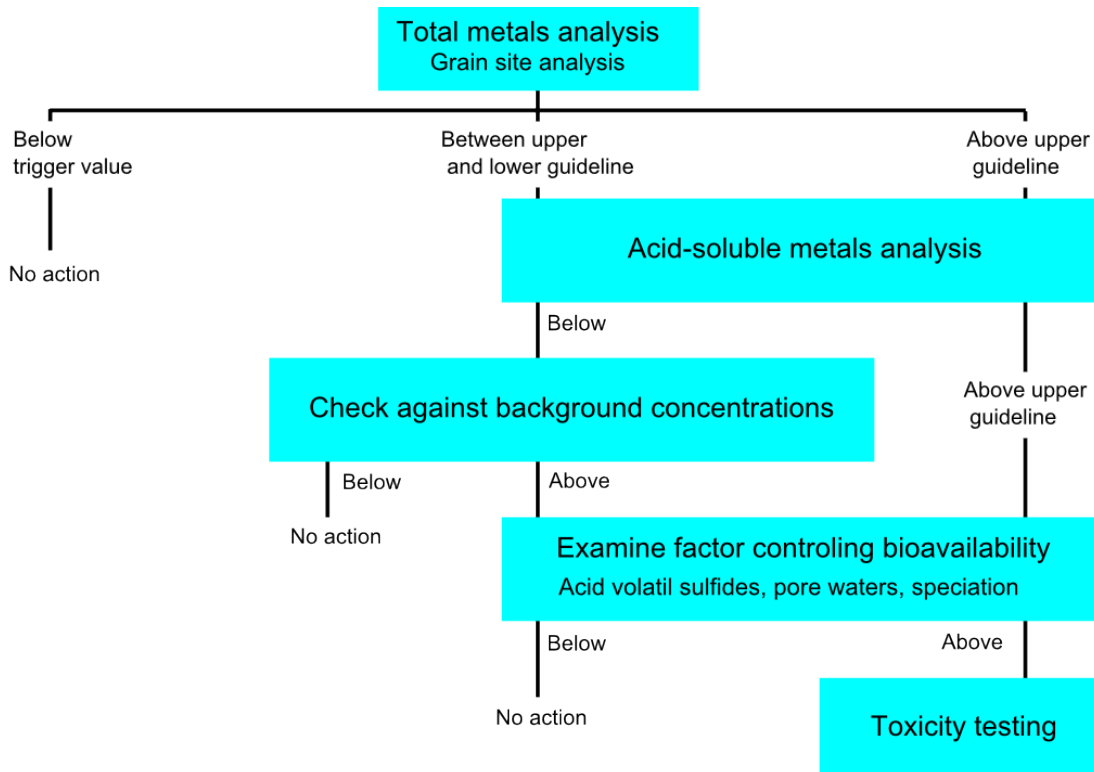


FIGURE 20: Arbre de décision pour l'analyse du risque lié aux métaux dans les sédiments dans la législation australienne

**Par valeurs déclencheuses** La plupart des pays ont choisi une méthode étagée (en anglais "tiered") par "valeurs déclencheuse" ( en anglais : trigger values), où le résultat de chaque étape est comparé avec une valeur limite qui déclenche l'étape suivante. Cette méthode prend tout son sens si le nombre de voies d'investigations disponibles est plus grand (que seulement les trois de la TRIAD) et est donc plus ambitieuse. De cette les moyens déployés seront donc adaptés au résultats recherchés, au moyens et aux enjeux.

L'exemple de la figure 20 montre l'arbre de l'étude des métaux lourds en Australie[58] et illustre bien les avantages de cette méthode, c'est pourquoi nous avons choisi cette approche pour notre étude. Bien sur, notre arbre est beaucoup plus simple et les "résultats déclencheurs" sont des interprétations et non des "valeur déclencheuses" en l'absence d'une législation claire sur les attentes de ces tests.

#### 4.1.2 Prolonger l'approche TRIAD

Cette discussion est tirée de la publication de Chapman et al.[11] sur les voies d'investigations disponibles et en développement pour remplacer ou prolonger l'approche TRIAD. Ainsi, les enjeux liés au site tel que la protection de l'environnement ou l'utilisation de la rivière pour des activités particulières peut amener à chercher des réponses spécifiques que l'approche TRIAD ne fournit pas ou avec trop peu de détails. Ces autres voies d'investigations évoluent rapidement avec l'état des connaissances techniques. Chapman classe ces voies d'investigations alternatives ou complémentaires en plusieurs catégories :



- Les voies d'investigations pour remplacer une partie de la TRIAD : études des tissus des poissons ou de crustacées épibenthiques pour remplacer l'indice biologique.
- Les variations de voies d'investigations existantes : utilisation de bioessais sur sédiment entier en laboratoires ou *in situ*.
- L'addition de nouvelles voie d'investigation : étude de la colonne d'eau, des communautés bactériennes, de la bioamplification dans les poissons ou les espèces benthiques, utilisations de biomarqueurs (génotoxicité, mutagénèse), analyses des composé sulfurés réduits[16][18]
- Les voies d'investigations pour déterminer la causalité : morphologie des habitats, identification de la toxicité (en anglais TIE pour "Toxicity Identification Evaluation"), bioessais sur sédiment entier *in situ* et en laboratoire.

## 4.2 Sur la méthode d'échantillonnage et de préparation des échantillons

La normalisation des pratiques est une étape essentielle dans la mise en place et l'utilisation rationnelle d'une directive technique applicable partout en Suisse. Dans cette étude, des choix ont été faits, principalement sur la base des recommandations d'Environnement Canada[50]. Toutefois d'autres pratiques existent, notamment en Suisse. Cette partie est donc dédiée à expliquer et discuter ces choix, tant du point de vue théorique que pratique.

### 4.2.1 Représentativité temporelle

Dans notre étude, le choix a été fait d'échantillonner une seule fois, après un événement pluvieux pour pouvoir trouver des sédiments fins frais. Toutefois, comme l'écosystème riverain est soumis à de multiples variations, et cela a déjà été discuté dans la section 2.3, il est important qu'il y est une étude suivit des sites. Des échantillonnages doivent avoir lieu durant des saisons différentes (principalement printemps et début de l'automne) mais aussi sur plusieurs années. de cette manière seulement, l'on peut mieux tenir compte des variations des cycles de vie des organismes benthiques et des variations hydrologiques.

### 4.2.2 Représentativité spatiale

L'échantillonnage proposé a eu lieu sur la partie supérieure des sédiments du lit. De cette manière, seul l'horizon oxicque a été extrait. Dans l'horizon plus profond où des conditions anoxiques règnent, des microorganismes sulfo-réducteurs réduisent les sulfates contenue dans l'eau interstitielle en sulfures(-2). Ces sulfures forment des composés insolubles avec les métaux divalents qui se stockent ainsi dans les couches plus profondes. Les métaux ainsi complexés deviennent moins biodisponibles. Mais si les conditions du milieu changent, par exemple lors de la remise en suspensions des sédiment lors d'un dragage, les complexes se font oxider rapidement et les métaux retournent en solution. Si les métaux lourds sont mesurés dans des concentrations jugés importantes dans

les sédiments profond, et si les conditions sont réunies pour la croissance des ces bactéries (présence de sulfate et de matière organique pour leur croissances hétérotrophes), alors il peut être important de s'intéresser à la partie anoxique des sédiments pour juger du potentiel de stockage des métaux lourds, voir figure 20.

### 4.2.3 Fraction granulométriques des sédiments considérée

La question porte sur la fraction granulométrique de sédiment considérée pour leurs analyses physico-chimiques et les bioessais. En effet, comme la fraction la plus fine contient le plus de polluants, plusieurs auteurs dont Pardos et al.[44] utilise la fraction des sédiments inférieure à  $63\mu\text{m}$ . C'est aussi la pratique du canton de Berne pour l'analyse des métaux lourds dans les polluants (communication personnelle de Elmar Scheiwiller). De cette manière, on obtient des échantillons plus homogènes entre les stations et on observe aussi des concentrations de polluants plus élevés (donc plus facilement quantifiables).

Mais il y a plusieurs inconvénients, tout d'abord il faut une très grande quantité de sédiment brut extraits pour conduire une batterie de bioessais comme celle conduite dans cette étude. le problème se pose notamment pour de petits cours d'eau où la présence de cailloux et de roches grossières rendent l'extraction assez longue, il peut alors être impossible d'extraire suffisamment de sédiment fins.

Ensuite, un tamisage à  $63\mu\text{m}$  entraîne une modification notable des sédiments. Ainsi, la structure des sédiments, par exemple des agrégats organiques est détruite, pouvant impliquer une modification de la toxicité des sédiments. Le "Document d'orientation sur le prélèvement et la préparation de sédiments en vue de leur caractérisation physicochimique et d'essai biologiques" publié par Environnement Canada[50] recommande tout de même de tamiser à 1 ou 2mm pour retirer la plus grande partie de la macrofaune pouvant interférer avec les bioessais. C'est cette recommandation qui a été suivit.

## 4.3 Sur les recommandations pour la qualité des sédiments

### 4.3.1 Méthode basée sur des sites de références

La méthode basée sur des sites de références est la plus simple et la plus rudimentaire et a souvent été le premier pas fait pour le développement d'une législation propre aux sédiments. Pour cette méthode, On définit un certain nombre de sites de référence par des mesures d'indices biologiques et des tests d'écotoxicologies. Ensuite, la moyenne des polluants analysés est calculée et sert de valeur de référence. La région de Flandre en Belgique, l'Italie, l'Allemagne et la France utilisent ou ont utilisés cette méthode pour dériver des valeurs de recommandations. En Allemagne par exemple, pour la gestion des sédiments côtiers, un facteur de 5 pour les métaux et de 3 pour les polluants organiques sont appliqués pour définir un deuxième niveau de référence. Cette méthode n'est donc pas basée sur l'effet mesuré mais sur un critère arbitraire.

### 4.3.2 Méthodes basée sur des relations entre polluants et toxicité observée sur des espèces de référence

Cette méthode permet de dériver les "recommandations sur la qualité des sédiments" telle que celle de MacDonald[35] utilisé dans notre étude. Les principes ont déjà été décrits dans la section 2.4.2. Elle a été utilisée en Amérique du Nord pour dériver plusieurs systèmes de RQS différents (TEC-PEC[35], ERL-ERM[33], TEL-PEL[36]). Plusieurs pays ont le projet de dériver leurs propres valeurs de recommandation, par exemple le Royaume Uni et la France mais comme une grande quantité de données sont nécessaire, cela réclame beaucoup de temps pour être mené à terme. Une solution provisoire peut être d'utiliser des RQS dérivées par d'autres pays et de vérifier leurs prédictibilités pour des données régionales à l'aide de bioessais sur le terrain et d'indices biologiques.

## 4.4 Sur l'indices biologique

En plus de l'indice biologique global normalisé (IBGN) utilisé plus haut, un autre indice est utilisé en Suisse dans le système modulaire gradué, le makroindex. Cet indice développé en Suisse[46], est basé sur le quotient "taxons insectes / taxons non-insectes". Les trois taxons d'insectes utilisés sont : les Ephéméroptères, les Plécoptères et les Trichoptères, les taxons de non-insectes sont à chercher parmi les crustacées, les vers et les mollusques. Le makroindex est compris entre 1 et 8, plus les eaux sont polluées et plus cet indice tend vers 8.

Cet indice a été déterminé en même temps que l'indice IBGN dans l'étude menée pour le canton de Berne[25]. Mais un seul des deux indices a été utilisé pour simplifier le traitement des données et l'interprétation.

Il existe en France un autre indice, l'indice "oligochète" (IOBS : normalisé en mai 2002 (NF T 90-390)<sup>11</sup>) dont il semble important de parler ici car il est un bon indicateur des PCBs et les métaux lourds. Il est basé sur l'observation de l'absence de soies capillaires chez les *Tubificidae*.

## 4.5 Sur les tests écotoxicologiques

### 4.5.1 Sur le choix des organismes d'essais

Les bioessais conduits durant cette étude ont permis d'observer que certains tests n'étaient pas adaptés aux extraits des sédiments car probablement trop stimulés par la présence de nutriments. Ainsi la stimulation masquerait un possible effet toxique. Des tests complémentaires sur d'autres sites pourraient confirmer cette hypothèse.

Le principal manque dans la batterie d'essais proposée est celui d'espèces benthiques sur sédiments entiers. L'intérêt principal de ces tests est qu'ils se font sur des espèces vivantes dans l'environnement dans l'étage benthique en contact direct avec les sédiments. Ce sont donc les plus représentatifs de la situation naturelle et des voies de contamination dans les sédiments. Pour cela ils semblent essentiels à une approche de type immission telle que la nôtre et qui s'intéresse à aux sédiments. Aussi, ces tests ont été utilisés pour la dérivation de toutes les valeurs de RQS récentes : pour les calculs de TEC et

11. <http://www.lesagencesdeleau.fr/francais/etudes/>

PEC par MacDonald et al.[35] par exemple, des bioessais de survie de croissance et de reproduction sur les amphipodes *Hyalella azteca*, de survie et de croissance sur les larves de *Hexagenia limbata*, de *Chironomus tentans* et *Chironomus riparius*, ou sur les vers *Lumbriculus variegatus*.

Un axe de recherche actuel est sur la mise en place de tests *in situ* avec des espèces benthique contenues dans des cages et en contact direct avec les sédiments naturels. De cette manière, la manipulation et la modification du sédiment est minimale. Tous les artefacts liés à l'échantillonnage et les bioessais en laboratoire sont supprimés. Par contre, la station d'échantillonnage se rétrécit et les effets liés à l'habitat jouent un rôle plus important de la même que pour la détermination d'un indice biologique.

Par l'instant en raison de l'absence du base légale sur la pollution des sédiments, ces test n'ont pas quitté les laboratoire de recherche universitaires et ne sont pas disponibles en Suisse romande.

#### 4.5.2 Sur le choix des extraits pour les bioessais

L'intérêt et l'interprétation des différents extraits (eaux de porosité, extraits aqueux et organiques) a déjà été discutée précédemment. Nous allons discuter ici des différences entre les méthodes d'extraction choisies et celles de la littérature.

Pour l'extraction de l'eau de porosité, les paramètres significatifs sont : la granulométrie des sédiments utilisés, leurs teneur initiale en eau, la durée et la vitesse de centrifugation. La méthode choisie est celle décrite par Environnement Canada[50]. La question de la granulométrie a déjà été discutée dans la section 4.2.3. La centrifugation y est privilégiée à la filtration utilisée ailleurs car elle diminue la toxicité de l'extrait.

Pour l'extraction aqueuse, le rapport du mélange varie entre 1 :4 et 1 :5 selon les publications. Nous avons suivi là aussi la recommandation d'Environnement Canada[50].

Pour l'extrait organique, on a utilisé une extraction avec du dichlorométhane, puis on a repris notre extrait dans du diméthyl sulfoxyde moins toxique pour les organismes d'essais. Une recherche dans la littérature a montré qu'aucune étude n'avait été menée pour confirmer le rendement de l'extraction pour les polluants organiques que nous étudions (PCBs et HAPs). D'autres solvants ont été utilisés dans la littératures (voir tableau 30). Il serait donc utile dans le futur de mener une étude comparatif de plusieurs solvant sur des sédiments contaminé standard pour connaître le rendement de l'extraction. Il faudrait aussi déterminer les NOEC (en anglais non observed effect concentration) du diméthyl sulfoxyde pour les organismes d'essais utilisés dans la batterie standard pour pouvoir choisir sereinement ces concentrations maximales de tests.

#### 4.5.3 Sur l'indice SED-TOX

L'intérêt de pouvoir calculer un indice unique à partir des résultats des bioessais est que l'on peut ainsi plus facilement intégrer la batterie de bioessais dans une approche étagée qui fonctionne sur des "valeurs déclencheuses". Pour cela le premier pré-requis est d'avoir défini une batterie d'essais standard mettant en évidence différents scénarios et espèces aux voies de contamination et aux sensibilités différentes.

Bien sûr, comme les résultats sont agrégés, il y a une importante perte de donnée. Le

Auteurs	Année	Solvant d'extraction	Solvant de reprise
Tarkpea et al.[56]	1986	Acétone	-
		DMSO <sup>(a)</sup>	-
		Propylène glycol	-
Campbell et al.[5]	1992	DCM <sup>(b)</sup>	Méthanol
			DMSO <sup>(a)</sup>
Cleveland et al.[13]	1997	DCM <sup>(b)</sup> :hexane (2 :8)	DMSO <sup>(a)</sup>
Johnson et al.[30]	1998	DCM <sup>(b)</sup>	DMSO <sup>(a)</sup>
Hong et al.[28]	1999	idem	idem
Guzzella et al.[26]	1998	Acétone :hexane (1 :1)	DMSO <sup>(a)</sup>
Vigano et al.[57]	2000	idem	idem

(a)DMSO = Dimethyl sulfoxide

(b)DCM = Dichlorométhane

TABLE 30: Comparaison de solvant utilisés pour l'extraction de polluants organiques pour des bioessais

calcul d'un indice ne peut donc pas complètement remplacer une interprétation "classique" : test par test et extrait par essai.

Ensuite, la question du poids à donner aux tests sur extraits organiques est importante. On a vu que dans le calcul de l'indice SED-TOX tel que définit par Bombardier et al.[3], le poids assigné aux extraits organique était égal à 0,1 alors qu'il était de 1 pour tous les autres types d'extraits. Ce poids est le résultat d'un choix "d'expert" mais n'a pas de base scientifique car la biodisponibilité des polluants organiques n'est pas encore bien comprise. En attendant que l'état de la connaissance progresse sur ce point, il serait approprié de retirer les tests avec extraits organique du calcul de l'indice SED-TOX et de les interpréter séparément. Par exemple pour juger du potentiel toxique des polluants organiques totaux et décider du choix de procéder à des études orientées sur la bioaccumulation et à la bioamplification.

Enfin, l'indice SED-TOX de Bombardier et al. est adapté au Canada qui possède des sédiments plus contaminés qu'en Suisse. Il faudrait donc adapter l'échelle de cet indice à la Suisse pour avoir une meilleure sensibilité entre les sites. Pour cela, il faudrait comparer des indices SED-TOX pour des sites suisses très pollués et des sites de référence et voir si l'indice SED-TOX reproduit bien la classification élaborée d'après des bioessais et des mesures d'indice biologiques.

## 5 Conclusion et perspectives pour le développement d'une législation suisse sur les sédiments

Dans l'objectif, inscrit dans loi fédérale sur la protection de l'environnement (article 1 de la LPE), de protéger les écosystèmes contre les atteintes nuisibles ou incommodes, l'approche par faisceau de preuve est toute indiquée. En effet, comme cette approche étant basée sur le milieu récepteur, elle permet de mieux mesurer l'impact des polluants et de pouvoir dans une certaine mesure en déterminer les sources.

Aussi, l'approche développée dans cette étude et appliquée à la rivière Urtenen a permis de mettre en évidence la pollution des sédiments par des polluants venant des ruissellements d'un tronçon d'autoroute et des eaux mixtes du déversoir d'orage de Bad. Elle a permis aussi de pointer les risques pour les communautés benthiques, sans toutefois pouvoir le confirmer complètement.

Pour l'amélioration de cette approche par faisceau de preuve, et pour déterminer l'impact des espèces les plus directement menacées par cette pollution, il semble que certaines améliorations sont nécessaires. Notamment, l'utilisation de tests écotoxicologiques sur des espèces benthiques est essentielle pour déterminer la contamination des sédiments. Ensuite, la loi suisse doit se doter de valeurs recommandations sur la qualité des sédiments basé sur les relations dose-effets de polluants par classes et en mélange. Cela peut se faire en utilisant des valeurs de recommandations développés par d'autres pays et dont la prédictibilité serait évaluer pour des sites suisses sur la bases d'études *in situ*. Une étape indispensable à cela et la standardisation d'une approche par faisceau de preuve qui permettrait de qualifier la qualité des sédiments.

## 6 ANNEXES

### 6.1 ANNEXE : Protocole d'échantillonnage et de stockage

Ce protocole est basé principalement sur le Document d'orientation sur le prélèvement et la préparation de sédiment en vue de leur caractérisation physicochimique et d'essais biologiques publié par Environnement Canada[50]. Il a été adapté à notre besoin.

#### Déterminer les objectifs de l'étude

Préciser le lieu de l'échantillonnage sur une carte. déterminer le lieu précis d'accumulation de sédiments fin sur place et délimiter la zone de prélèvement sur une carte. Quels sont les objectifs, la précision requise. données historiques

#### Mesures et observations sur le terrain

Les renseignements à consigner et mesurer à chaque prélèvement à une station d'échantillonnage sont :

- Numéro de l'échantillon et identification de la station.
- Heure et date du prélèvement.
- Conditions météorologiques ambiantes : température de l'air.
- Type d'échantillonneur utilisé.
- Profondeur de l'eau et des sédiments prélevés à chaque sous-échantillon, volume de sédiments extraits
- Température, conductivité, pH et concentration en oxygène dissous de l'eau dans la rivière et à l'interface eau-sédiment.
- Potentiel d'oxydo-réduction dans les sédiments.
- Nom de la personne effectuant le prélèvement
- Description du sédiment : texture, consistance, couleur, odeur, présence d'organisme observable à l'œil.

#### Prélèvement

Le prélèvement se fait avec une benne de type ponar permettant le sous-échantillonnage. Toutefois elle ne permet pas de conserver les conditions anoxiques du sédiment.

Les prélèvements doivent se faire d'aval vers l'amont pour empêcher la contamination par la remise en suspension de sédiments.

Pour tenir compte de l'aspect hétérogène des sédiments de la station et si nous avons besoin d'une quantité importante de sédiment, nous devons prélever plusieurs

L'espacement entre les prélèvements des différents échantillons se fait dans la zone de prélèvement délimitée, l'espacement entre les différents sous-échantillons et leurs nombres dépend de la quantité de sédiment nécessaire et du volume minimale représentatif déterminé par l'équation de Gy[27].

Les sédiments en contact direct avec la benne ne doivent pas être conservés pour éviter la contamination avec la paroi, la benne est rincer avant le prélèvement avec l'eau de la station.

Seule la partie supérieure oxygène de chaque prélèvement est conservée par sous-échantillon. En effet la partie anoxique présente une composition chimique et une biodisponibilité des polluants potentiellement très différente. Après sa mise en contact avec l'oxygène, les qualités changent mais ne peuvent être maîtrisées, de plus la probable forte concentration en soufre réduit peut avoir une forte influence sur les bioessais avec des extraits organiques

Les sédiments sont tamisés à 2mm sur place pour retirer les particules grossières.

### **Critère de validité**

- L'eau sus-jacente(s'il y en a) est limpide ou pas excessivement trouble.
- La profondeur de pénétration voulue a été atteinte.
- Il n'y a pas de signe de fermeture incomplète de la benne.

### **Transport et stockage**

Tous les sédiments peuvent être conservés dans des récipients en polyéthylène de haute densité (HDPE) sauf la fraction destinée aux mesures de polluants organiques (HAPs et PCBs) qui doit être conservée dans du verre ambré avec de l'aluminium dans le bouchon (soit 960 ml d'échantillon humide).

L'extraction de l'eau interstitielle (ou de porosité) doit être faite dans les 24 heures suivant le prélèvement et doit être utilisée pour les bioessais le plus rapidement possible. Pour la fraction destinée aux analyses des métaux, un stockage de 6 semaines à  $4 \pm 2^\circ\text{C}$  avec une addition de 2 ml de  $\text{HNO}_3$  à 1 M par litre de solution est souhaitable. Pour la fraction destinée à l'analyse des polluants organiques, aucun ajout n'est nécessaire pour un stockage n'excédant pas 6 semaines.



## 6.2 ANNEXE : Protocole pour le nettoyage de la vaisselle utilisée

Pour les récipients HDPE utilisés pour la détermination des métaux : rincer au  $HNO_3$  puis 3 fois à l'eau déminéralisée et 3 fois à l'eau millipore. Laisser sécher.

## 6.3 ANNEXE : Protocole pour la pré-centrifugation des sédiments

Cette procédure est appliquée à la fraction de sédiments destinée au bioessais avec sédiment entier, à être sécher avec le sulfate de sodium, à l'extraction aqueuse et à l'extraction organique. Les sédiments sont d'abord tamisés à 2mm pour retirer les particules grossières. Ensuite, on les centrifuge pendant 10 minutes à 2000 rpm et à 4°C. On retire le surnageant. On mesure la teneur en eau de la fraction restante en la séchant au four 12 heures à 105°C.

## 6.4 ANNEXE : Protocole pour l'analyse des métaux par ICP-OES

L'analyse des métaux par ICP-OES a eu lieu à l'EPFL avec l'aide de Jean-David Teuscher suivant le protocole en place dans son laboratoire[14].

### Principe

Méthode standard mise au point pour doser les éléments traces.

### Réactifs

- $H_2O$  Milli-Q
- $HCl$  suprapur Merk 318
- $HNO_3$  suprapur 441

### Matériel

- erlenmeyers de 100 ml
- plaques chauffantes
- filtres acétate de cellulose 0.45  $\mu m$
- ballons jaugés de 50 ml

### mode opératoire

1. Introduire 1 g d'échantillon sec dans un erlenmeyer de 100 ml.
2. Ajouter 2-3 ml d'eau Milli-Q pour obtenir une pâte puis 7.5 ml  $HCL$  supra pur Merk 318 et 2.5 ml  $HNO_3$  suprapur Merk 441.
3. Boucher et laisser reposer une nuit à température ambiante.
4. Bouillir gentiment à reflux pendant 2 heures sur une plaque chauffante.

5. Laisser refroidir puis rincer avec 30 ml  $H_2O$  en collectant le tout dans l'erlenmeyer.
6. Filtrer la solution à travers un filtre de cellulose 0.45 m.
7. Rincer le filtre environ 5 fois avec quelques ml d'acide nitrique 2.0 M
8. Après refroidissement, jauger à 50 ml avec  $HNO_3$  2.0 M.
9. Doser les éléments tracés par ICP-OES ou ICP-MS.

### Calcul

soit :

- $P$  : Poids en gramme du solide
- $V$  : volume final en ml
- $R$  : résultat de l'analyse en mg/l
- $T$  : résultat de l'analyse en ppm

$$T = \frac{R * V}{1000 * P * 10} \quad (8)$$

## 6.5 ANNEXE : Protocole pour l'analyse des métaux par fluorescence X

L'analyse des métaux par fluorescence X a eu lieu au Centre d'analyse minéral de l'UNIL avec l'aide de Jean-Claude Lavanchy et Morgane Tournier.

### Préparation des pastilles

1. Broyer 100 g d'échantillon séché à 105°C avec un broyeur à disque oscillant (garniture en carbure de tungstène).
2. Mélanger 15 g d'échantillon broyé avec du MOWIOL® pour obtenir un mélange pâteux.
3. Mettre sous presse.
4. Presser 1 minute à 5 bar pour obtenir une pastille.
5. Sécher la pastille au four une nuit à 105°C.
6. Analyser la pastille par fluorescence X.

## 6.6 ANNEXE : Protocole pour l'analyse des HAPs et des PCBs

L'analyse des PCBs et des HAPs dans les sédiments a eu lieu au Laboratoire central SIE à l'EPFL avec l'aide de Dominique Grandjean et de Rachel La Mendola.

## Extraction liquide-liquide

### Réactifs

- ampoule à décanter de 0,5 litre
- ballon coeur de 250 ml
- ballon rond 250 ml
- entonnoir
- système de chauffage à reflux

### Matériel

- Méthanol
- KOH
- n-Pentane
- Sulfate de sodium anhydre

**Mode opératoire** Toute la verrerie est rincée à l'acétone, puis à l'hexane. Faire un blanc de la verrerie.

Le sédiment est tamisé à 2mm. Un poids sec est déterminé. Peser dans le ballon rond de 250 ml, 20g de sol, ajouter 100ml de mélange méthanol/KOH 2N et chauffer à reflux pendant 2 heures. Laisser refroidir. Verser la partie liquide dans l'ampoule de 0.5L et extraire avec 3 x 40ml de n-Pentane. Sécher les extraits organiques sur sulfate de sodium. Concentrer au Rotavapor (40°C, 900 mbar) jusqu'à 1ml et purifier sur colonne de silica gel et alumine.

## Purification et séparation sur colonne de chromatographie silica gel et alumine

- Silica gel 60 (70-230 mesh) Merck 107734
- Oxyde d'aluminium (70-230mesh) Merck 101077
- n-hexane
- dichloromethane
- isopropanol
- Sulfate de sodium anhydre
- Eau MilliQ

**Préparation des adsorbants** L'alumine (70-230 mesh) est activée à 400°C pendant 12h (une nuit). Le silicagel 60 (70-230 mesh) est activé 12h à 180°C (une nuit). Puis les poudres sont désactivées avec 5% poids/poids avec de l'eau MQ. Elles sont agitées 20min à l'agitateur tangentiel (intensité maximum) puis les laissées reposer au minimum 4h00 avant utilisation. Les poudres sont utilisables 24h.

### Matériel

- 1 colonne pour chromatographie : 40 cm de long, 10mm de diamètre munie d'un robinet
- 1 ballon coeur de 50 ml avec bouchon
- 1 ballon coeur de 100ml avec bouchon

- 1 cylindre gradué de 50 ml
- 1 support de laboratoire
- 1 pince et une double noix
- 1 réservoir pour colonne de chromatographie à solvant de 100ml
- 2 cylindres gradués de 100ml avec bouchon de verre

**Mode opératoire** Une colonne de verre de 40 cm de long 10 mm de diamètre équipée d'un robinet et munie d'un morceau de laine de verre est préparée sous forme " slurry " avec 6g de silicagel 60 désactivé et 6g d'alumine désactivé (préparées comme ci-dessus) , puis 2g de sulfate de sodium anhydre sont ajoutés au sommet de la colonne. L'addition de l'échantillon 0,5 à 1ml est réalisée comme suit :

1. Le solvant se trouvant au sommet de la colonne est élué goutte à goutte (débit approx : 1ml/min) jusqu'à ce que le haut du sulfate de sodium soit sans solvant.
2. L'échantillon est ajouté au moyen d'une pipette pasteur (pipette longue), puis le ballon est rincé 3\* avec 1ml d'hexane. Avant chaque ajout de rinçage sur la colonne il faut laisser le précédant s'éluer sur la colonne, le sommet de la colonne doit être à chaque fois exempt de solvant.
3. Puis l'échantillon est élué comme ci-dessous :
  - a : 20 ml hexane (HC)
  - b : 20 ml hexane :dichlorométhane 95 :5 (PCB+PAH)
  - c : 40 ml hexane :dichlorométhane 80 :20 (PAH)
4. Combiner les fractions b+c dans le même ballon de 100ml, concentrer à 1ml et transvaser dans un flacon taré de 1.8ml. Rincer avec de l'isopropanol et concentrer sous flux d'azote jusqu'à 0.5ml. Injecter sur HPLC fluorescence. Le taux de récupération et la limite de détection de la méthode sont indiqués ci-dessous.

### Détection HAPs

Chromatographe en phase liquide couplé à un détecteur par fluorescence (HPLC-FLD). Système HP1050, colonne Vydac 201TP54 (25cm x 4.6mm), 1ml/min, 50 :50% ACN :eau, gradient à 100% ACN en 20min., 10min. à 100% ACN. Temps total : 40 minutes.

### Détection PCBs

Chromatographe en phase gazeuse couplé à un détecteur à capture d'électron (GC-ECD).

## 6.7 ANNEXE : Protocole pour l'analyse de l'ammonium

### Matériel nécessaire

L'analyse de l'ammonium a eu lieu dans le laboratoire ECOL( ecological engineering laboratory) à l'EPFL et a été faite par Htet Kyi Wynn.

## Mode opératoire

La bonne conservation de l'ammonium n'est pas assurée à 4°C après 2 jours, il est donc préférable de mesurer l'ammonium le plus tôt possible. Sinon l'eau de porosité peut être conservé 6 mois à -20°C dans du verre ambré munis d'un bouchon en teflon®[50].

Le dosage est fait par chromatographie ionique et détecteur conductimètre (appareil ICS 3000 de Dionex, colonne CS16, suppresseur CSRS4) sur les eaux interstitielles préalablement filtrées à 0,2µm.

## 6.8 ANNEXE : Protocole pour l'extraction organique et l'analyse du soufre élémentaire

L'analyse du soufre élémentaire dans les sédiments a été faite au laboratoire central à l'EPFL par Virginie Brissonnette. L'extraction organique sert à la fois aux bioessais et à la détermination du soufre élémentaire.

### Principe

Analyser le soufre élémentaire dans les sédiments. Le soufre est identifié par chromatographie en phase gazeuse couplé à un détecteur à capture d'électron (GC-ECD). Le GC-ECD est un Hewlett Packard HP5890 avec colonne capillaire de type DB5 (60m x 0.25mm i.d. x 0.25µm d'épaisseur de film). L'Hélium est utilisé comme gaz porteur à 28cm/s et à 35psi. Le programme de température du four est le suivant : 150°C, 2 min. ; 3°C/min. jusqu'à 280°C, 10 min. soit un temps d'analyse de 55 min.. L'injecteur est en mode split (ratio 17 : 1) est programmé en isotherme à 250°C. Le détecteur ECD est chauffé à 350°C avec 5,5ml/min N2 pour l'anode et 55ml/min N2 pour le make-up. Le volume injecté est de 3 µl. Le signal est enregistré sur un intégrateur HP3396 (attn=0). La quantification est faite par standard externe (gamme de concentration pour la quantification : de 1 à 20 µg/ml hexane) à partir d'une solution mère de 15mg/50ml d'Acétone. Le solvant utilisé est l'Hexane. La limite de détection de l'appareil est de 0.011 µg/ml et de 0.003 µg/g pour un échantillon de sédiment (30g de sédiment extrait et repris dans 4ml d'hexane).

### Réactif

- Sulfate de sodium
- DCM
- DMSO
- N-hexane

### Matériel

- tamis en métal 2mm
- racloir
- pipette

- tube à centrifuger HDPE
- centrifugeuse
- balance
- four à 105°C
- spatule
- barquette en aluminium
- agitateur
- erlenmeyer 1l.
- entonnoir
- fibres de verre
- ballons coeur 250ml
- rotavapeur
- vial de 4ml tarré

## Mode opératoire

1. Environ 50-60g de sédiment sont tamisé à 2mm.
2. Rincer le tamis avec de l'eau déminéralisée.
3. Transférer le sédiment dans le tube à centrifuger HDPE. Centrifuger 10 min. à 2000 rpm.
4. Eliminer le surnageant.
5. 10g de sédiments centrifugés sont utilisés pour déterminer la teneur en eau.
6. Pour la préparation de l'extrait organique, 30g de sédiments centrifugés sont ajoutés à 100g de sulfate de sodium (dans une barquette en aluminium) afin de sécher la matrice.
7. Une fois sec (poudre fine et beige), ajouter 200ml de dichlorométhane (DCM) dans un erlenmeyer de 1litre.
8. Puis agité (agitateur tangentielle) à 280 rpm à température ambiante (17-20°C) pendant une nuit (12h).
9. Filtrer l'extrait organique sur entonnoir avec fibres de verre et sulfate de sodium.
10. Concentrer par évaporation (au rotavapor à 40°C, 800mbarr) à environ 4ml.
11. Transférer l'extrait dans une vial pour chromatographie de 4ml (tarré).
12. Conserver les échantillons à 4°C. 2ml sont utilisés pour les bioessais (reprise dans 1,5-3ml de DMSO).
13. Pour l'analyse du soufre élémentaire, les 2ml restant sont évaporés à sec sous flux d'azote et repris dans 4ml d'hexane. Contrôle de l'évaporation sous flux d'azote. 88,5% +/- 5,9 (n=3) de récupération de soufre sur un standard.
14. Injecter sur GC.

## 6.9 ANNEXE : Protocole pour la mesure de la granulométrie

### Réactif

- $Na_4P_2O_7$  (Pyrophosphate de sodium) 40 g/L

- $H_2O_2$  (Eau oxygénée) 10 % et 35 %

## Matériel

- balance ( $\pm 0.01$ g)
- balance ( $\pm 0.0001$ g)
- allonges en verre étalonnées à 500 ml + bouchons
- capsules en verres
- pipette jaugée de 20 ml
- thermomètre
- chronomètres
- agitateur rotatif
- bloc chauffant
- système à reflux
- tamis 50  $\mu$ m
- tamis 200  $\mu$ m
- étuve

## Mode opératoire

1. Peser précisément 10 g de sol tamisé à 2 mm et l'introduire dans une allonge de 500 ml.
2. Ajouter avec précaution 100 ml d'eau oxygénée 10 % (attention à la réaction !).
3. Placer les allonges dans le bloc chauffant et installer le système à reflux. Chauffer deux heures en position maximum. Surveiller la réaction pour éviter les débordements.
4. Ajouter 10 ml d'eau oxygénée 35 % par le haut du réfrigérant. Attendre la fin de la réaction et répéter l'opération 2-3 fois si c'est nécessaire jusqu'à complète destruction de la matière organique.
5. Chauffer encore 4 heures, puis éteindre la plaque. (Il n'y a plus d'effervescence)
6. Soutirer le surnageant en contrôlant l'absence d'eau oxygénée résiduelle (pas de décoloration de  $KMnO_4$ ).
7. Ajouter 15 ml d'une solution de pyrophosphate de sodium 40 g/L et compléter avec de l'eau déminéralisée jusqu'au trait de jauge. Boucher l'allonge et agiter une heure sur l'agitateur rotatif.
8. Numéroter et peser 5 capsules en verre par échantillon ; elles seront utilisées ultérieurement pour y recueillir les différentes fractions (utiliser la balance à 0.0001 g).
9. En vue du prélèvement des silts et des argiles, relever la température des solutions et déterminer sur le tableau 31 les temps t1, t2 et t3 de prélèvement.
10. Agiter manuellement l'allonge pendant une minute. Reposer le cylindre et déclencher exactement en même temps le chronomètre. Les opérations suivantes doivent se faire très rapidement mais en évitant de perturber la sédimentation.

Fractions	Profondeur	18°C	19°C	20°C	21°C	22°C	23°C	24°C
t1(A+LF+LG)	20 cm	1'34"	1'32"	1'29"	1'27"	1'25"	1'23"	1'21"
t2(A+LF)	20 cm	9'47"	9'32"	9'18"	9'05"	8'52"	8'40"	8'28"
t3(A)	5 cm	4h05'	3h58'	3h52'	3h47'	3h41'	3h37'	3h32'
	20 cm		16h24'	16h00'	15h36'	15h14'	14h52'	14h32'

TABLE 31: Relation entre la température et le temps en fonction de la profondeur de prélèvement

11. Au temps t1, aspirer 20 ml de suspension à 20 cm en dessous du niveau du liquide (correspond au haut de la marque de la pipette) et rejeter la suspension dans la capsule en verre préalablement tarée. Rincer la pipette à l'eau déminéralisée en prenant soin de recueillir tout le liquide dans la capsule.
12. Répéter les points 10 et 11 au temps t2 et t3.
13. Superposer le tamis de 200  $\mu\text{m}$  à celui de 50  $\mu\text{m}$  dans un lavabo. Transvaser le contenu de l'allonge dans le tamis supérieur. Rincer abondamment sous l'eau du robinet jusqu'à ce que l'eau s'écoulant des tamis soit exempte de suspension.
14. Recueillir le contenu de chaque tamis dans les capsules préalablement tarées et numérotées puis les mettre à sécher dans une étuve à 105°C pendant une nuit.
15. Sortir les capsules de l'étuve, les laisser refroidir environ une heure à l'abri de l'humidité. Peser chaque capsule à  $\pm 0.0001$  g et en déduire le poids net de chaque fraction.
16. Calculer chaque fraction en % du total. ( $\Sigma$  masses des fractions = 100%)
- 17.

## 6.10 ANNEXE : Protocole pour l'extraction de l'eau interstitielle

### Mode opératoire

- Homogénéiser : pour conserver le léger surnageant décanté durant le stockage de l'échantillon.
- Centrifuger : 30 minutes à 2000rpm (environ 10'000g).
- Laisser décanter jusqu'à l'utilisation

## 6.11 ANNEXE : Protocole pour l'extraction aqueuse

### Mode opératoire

- Homogénéiser
- Mélange avec l'eau de dilution dans un rapport (1 :4)
- Culbuter : pendant 30 minutes à 12tr /min.
- Centrifuger : pendant 10 minutes à 2000 rpm.



- Décantier, il peut être utile de décantier plus longtemps (mais pas filtrer) pour les tests Microtox®
- Sécher des sédiment pré-centrifugés(pesés avant) avec du sulfate de sodium.
- Agiter avec dichlorométhane pendant 12 heures à température ambiante.
- Filtrer sur sulfate de sodium.
- Concentrer avec rotovapeur.
- Reprendre dans DMSO.
- Concentrer avec rotovapeur.

## 6.12 ANNEXE : Calcul de l'indice SED-TOX

Le calcul est fait en deux étapes : d'abord la conversion des données puis l'intégration des données.

### La conversion des données

Cette première étape a pour but de rendre les résultats des différents bioessais adimensionnels, mais aussi de les normaliser par rapport au poids équivalent de sédiment sec correspondant à la phase d'essai.

**Conversion en unité toxique poids frais** Cette conversion se fait différemment selon qu'il s'agisse d'un test quantique (basé sur la survie d'organisme) ou non (basé sur la croissance, la reproduction..).

Pour les tests non quantiques, l'unité toxique poids frais (noté  $UT_{pf}$ ) se calcule avec la plus grande concentration testée ( $C_{max}$  donnée en % v/v, % w/v, mg/l ou  $\mu\text{g/l}$ ), le facteur de dilution de chaque test ( $D$ ) et la concentration caractéristique d'effet(endpoint) (notée  $C_{tox}$  pouvant être une  $EC_{100}$ ,  $EC_{50}$ ,  $EC_{25}$  ou une TEC en % v/v, % w/v, mg/l ou  $\mu\text{g/l}$ ). Si pour un test, on ne peut calculer de  $CE_x$ , on applique une valeur à  $C_{tox}$  la valeur  $C_{max}$ .

$$UT_{pf} = \frac{C_{max} \times D}{C_{tox}} \quad (9)$$

Pour les tests de type quantiques, on utilise la réponse maximum  $R_{max}$  (c'est à dire 100% de survie des organismes) et la réponse mesurée  $R_{tox}$  pour calculer  $UT_{pf}$ .

$$UT_{pf} = \frac{R_{max}}{R_{tox}} \quad (10)$$

**Expression des différents compartiments du sédiment total** A partir de la teneur en eau du sédiment total (notée  $tm$  en g  $H_2O$ / g de sédiment total) et de la teneur en eau du sédiment centrifugé (notée  $cm$  en g  $H_2O$ / g de sédiment centrifugé), on exprime la masse en eau des deux phases : l'eau de porosité extraite par centrifugation (notée  $x$  en g  $H_2O$  centrifugé/ g de sédiment total) et l'eau de porosité qui n'est pas extraite par centrifugation (notée  $y$  en g  $H_2O$  non-centrifugé/ g de sédiment total), par rapport à la quantité de sédiment sec contenue dans le même volume de sédiment

complet (notée  $z$  en g de sédiment sec/ g de sédiment total). On obtient ainsi les relations 11, 12 et 13.

$$x = 1 - tm \quad (11)$$

$$y = \frac{cm \times z}{1 - cm} \quad (12)$$

$$z = \frac{cm \times (1 - tm)}{1 - cm} \quad (13)$$

**Normalisation des phases d'essais par rapport à leur fraction dans le sédiment** Pour chaque phase utilisé pour un bioessai (eau de porosité, extrait organique, extrait aqueux), on calcule un coefficient  $p$  correspondant à sa composition. Ainsi  $p_{porosite}$  à la valeur  $x$ . Ici, Manon Bombardier fixe à l'extrait organique la valeur 1 car tous les compartiment seraient compris dedans. Mais cela ne correspond pas avec notre protocole expérimentale car nous avons centrifugé notre sédiment avant de le sécher avec du sulfate de sodium. Nous donnons donc à  $p_{ext-org}$  la valeur  $y + z$ . Pour un extrait aqueux, nous prenons une valeur de  $p_{ext-aq}$  égale à  $y + z$ . Les deux extraits représentent bien le même compartiment du sédiment complet.

**Expression des unités toxiques en masse de sédiment sec** On convertit les résultats des bioessais exprimée en unités toxiques poids frais pour les exprimer unité toxique poids sec selon la formule 14.

$$UT_{ps} = UT_{pf} \times \frac{p}{z} \quad (14)$$

**Ajustement lié à la sensibilité des bioessais** On ajuste la valeur d'unité toxique poids sec par la limite de détection du bioessai. Cette limite de détection (notée  $DL$ ) et calculée à partir du facteur de dilution  $D$  et des valeurs moyennes  $p$  et  $z$  (moyennes arithmétiques notée  $\bar{p}$  et  $\bar{z}$ ) mesurées pour l'ensemble des échantillons de l'étude.

$$DL = D \times \frac{\bar{p}}{\bar{z}} \quad (15)$$

On classifie les tests en deux catégories, les essai quantiques et les test quantitatifs. les tests basés sur la mortalité et dont les résultats correspondent au nombre de réalisation du risque sont les tests quantiques. tous les autres tests (basés sur la croissance ou la reproduction) sont donc quantitatifs et la réponse est une quantité proportionnelle à l'effet d'intérêt. La valeur ajustée est appelée le facteur d'incrément toxique  $FIT$  et est définit par le quotient suivant pour les essais non-quantiques :

$$FIT = \frac{UT_{ps}}{DL} \quad (16)$$

Pour les essais quantiques, il faut déterminer le pourcentage minimum non-toxique (notée  $R_{min}$ ) puis calculer le  $FIT$  comme suit :

$$FIT = (R_{min} - R_{tox}) \times \log(R_{max} - R_{tox}) \quad (17)$$

Si le  $FIT$  prend une valeur négative on lui assigne une valeur nulle.

Bombardier propose un classement de l'effet toxique basé sur le  $TIF$  calculé : l'échantillon est donc déclaré non toxique pour une valeur nulle, faiblement toxique entre 1 et 10, moyennement toxique entre 10 et 99 et fortement toxique au dessus de 100.

### L'intégration des données

On calcule d'abord la toxicité de phase pondérée (notée  $TPP$ ) à partir des  $FIT$  calculés pour une phase données à partir de l'ensemble des endpoints (ou  $EC_x$ ). On définit :  $N$  le nombre de  $EC_x$  (ou endpoint) et de  $(a-c)$  les facteurs de sensibilité. Par défaut, ils sont fixés à 1. Pour l'extrait organique, il est fixé dans la publication à 0,1 arbitrairement pour tenir compte du fait que cet extrait rend biodisponible une plus grande fraction de polluant que dans le sédiment original.

On définit aussi  $r$  le facteur de redondance. Il mesure la redondance entre les différentes phases. On le calcule comme le nombre de sédiment complet compris dans toutes les phases testées. Ainsi, l'eau de porosité(x) et l'extrait organique (y + z) donne une valeur de 1. L'extrait aqueux donne une valeur a déterminé(mais inférieure à 1).

On peut ensuite calculé la moyenne cumulée des phases  $MCP$  :

$$MCP = \frac{a \frac{\sum FIT_{porosite}}{N_{porosite}} + b \frac{\sum FIT_{ext-aqueux}}{N_{ext-aqueux}} + c \frac{\sum FIT_{ext-org}}{N_{ext-org}}}{r} \quad (18)$$

On calcule ensuite l'indice SED-TOX comme

$$SED - TOX = \log_{10}(1 + n(MCP)) \quad (19)$$

## 6.13 ANNEXE : Protocole pour les bioessais Microtox®

Ces bioessais sont des tests aiguës basée sur la diminution de luminescence des bactéries marines *Vibrio Fischeri* après 5, 15 et 30 minutes. Le spectrophotomètre et les réactifs bactériens sont commercialisés sous le nom de Microtox® par la société Azur Environnement®. Le protocole utilisé pour ces tests est celui conseillé par le producteur et adapté par Serge Santiago de l'entreprise Soluval. Les test sur phases solides suivent aussi les recommandations d'Environnement Canada[9].

## 6.14 ANNEXE : Protocole pour les bioessais sur *Daphnia magna*

Ces bioessais sont des tests aiguës basé sur la survie des puces d'eaux *Daphnia magna* après 48 heures de contact avec l'échantillon. Les organismes sont issus des élevages de Serge Santiago. Le protocole suivi est celui d'Environnement Canada[8].

### 6.15 ANNEXE : Protocole pour les bioessais chronique sur les *Brachionus calyciflorus*

Ces bioessais sont des tests chroniques basés sur la reproduction de la première génération de rotifères *Brachionus calyciflorus* durant 48 heures. ce test est commercialisé par la société MicroBioTests Inc. sous le nom de Rotoxkit®, les organismes étant fournis sous forme de cystes. Le protocole utilisé est celui fournit par la société et est disponible en ligne<sup>12</sup>.

### 6.16 ANNEXE : Protocole pour les bioessais chroniques sur *Ceriodaphnia dubia*

Ces bioessais sont des tests chroniques basés sur la reproduction d'une génération de puce d'eaux *Ceriodaphnia dubia* durant 7 jours. Les organismes sont issus des élevages de Serge Santiago. Le protocole suivi est celui d'Environnement Canada[6].

### 6.17 ANNEXE : Protocole pour les bioessais sur les algues vertes

Ces bioessais sont basés sur la croissance durant 72 heures des algues vertes *Pseudokirchneriella subcapitata* avant nommée *Selenastrum capricornutum*. Le protocole suivi est celui d'Environnement Canada[7].

### 6.18 ANNEXE : Protocole pour les bioessais sur les lentilles d'eaux

Ces bioessais sont basés sur la croissance des lentilles d'eau *Lemna minor* durant 7 jours. Le protocole suivi est celui d'Environnement Canada[10].

### 6.19 ANNEXE : Rapport des activités

### 6.20 Volumes estimés de sédiments humides nécessaires

Les volumes sont donnés en millilitres de sédiments humides.

- 6l de sédiments humides pour récupérer 3l d'eau interstitielles pour les bioessais.
- 500 ml pour l'extraction aqueuse (à 1 :4) pour les bioessais.
- 500 ml pour l'extraction organique pour les bioessais.
- 100 ml pour le test Microtox® en phase solide.
- 90 ml pour l'extraction à l'eau régale pour l'analyse des métaux.
- 130 ml pour mesurer les métaux dans l'eau interstitielle.
- 150 ml pour l'extraction organique par soxhlet pour l'analyse des PCBs et HAPs.
- 1000 ml pour l'analyses des PCBs et HAPs dans l'eau interstitielle.
- 30 ml pour l'analyses des PCBs et HAPs dans l'extrait organique servant aux bioessais.

---

12. [http://www.biohidrica.cl/pdfs/rotoxkit\\_m-protocol.pdf](http://www.biohidrica.cl/pdfs/rotoxkit_m-protocol.pdf)

- 120ml pour l'analyse du soufre total par fluorescence X.  
cela donne un total de 9 litres de sédiment humides à échantillonner à chaque station.

## 6.21 Volume et type de sédiments pour chaque analyse et test

- Ammonium : eau de porosité à conserver dans les tubes en plastique et analyser rapidement : demander à Htet Kyi.
- TOC-DOC dissoud : eau de porosité à filtrer à  $0,45\mu\text{m}$  et conservé dans les tubes en verre et analyser rapidement.
- TOC-DOC solide : 5-10 g de sédiment séché à  $100^{\circ}\text{C}$  et broyé.
- Métaux solide : extraction par eau régale de 3\*5g de sédiment sec.
- Soufre et métaux par fluorescence : 20g de sédiment sec (quel séchage, le même que pour l'extraction régale).
- Métaux en solution : eau de porosité acidifiée avec  $\text{HNO}_3$  conservé dans petite fiole en plastique.
- PCB-HAP extraction solide : sécher à  $40^{\circ}\text{C}$  12 heures, contact avec solvant pendant 12 heures.

## 6.22 Plan de travail

### vendredi 23

- Mettre des coupelles en porcelaine vide au four à  $100^{\circ}\text{C}$ .

### Lundi 26

#### matin

- Sortir les coupelles en porcelaine vide du four et les placer dans le dessiccateur.
- Echantillonnage sur l'Urtenen à bern.

### Mardi 27

- Pré-centrifugation pour diminuer la teneur en eau des sédiment, voire page 77
- Sécher à  $105^{\circ}\text{C}$  les sédiments humides : pour la granulométrie (30g sec donc 100ml), et déterminer la teneur en eau du sédiment pré-centrifugé.
- Tamiser à  $0.063\mu\text{m}$  pour les analyses métaux et PCB-HAP et les bioessais avec extraction organique.
- Sécher à  $105^{\circ}\text{C}$  la fraction fine : pour TOC-DOC solide (20g sec), pour l'extraction des métaux par eau régale (20g sec), pour l'analyse par fluorescence (20g sec) : 50g sec donc 225ml humides fins soit 1000 ml de sédiments humides.
- Sécher à  $40^{\circ}\text{C}$  : fraction pour l'extraction organique pour analyse des PCB-HAP (20g de sédiment fins sec donc 200 ml de sédiment humide : ne pas remplir le flacon en verre jusqu'au sommet), puis les conserver aux frigo (jusqu'à 1 mois).
- Sécher avec  $\text{Na}_2\text{SO}_4^{2-}$  : fraction pour l'extraction organique pour bioessai (40g de sédiments sec soit 120ml de sédiment humides fins soit 400ml de sédiments humides).

- Commencer l'extraction organique pour bioessai : mélanger sédiment sec + DCM pour la nuit sur plateau vibrant.
- gGranulométrie ?? sédiment sec non tamisé fin(10g sec).
- Récupérer l'eau de porosité et la séparer en 4 fraction : pour les bioessais, pour l'analyse de l'ammonium, pour l'analyse TOC-DOC, pour l'analyse des métaux(ajout de  $HNO_3$ ).
- Extraction aqueuse : pour bioessais, (aussi analyse des métaux).

## **Mercredi 28**

- Extraction PCB HAP pour bioessai : reprendre extrait dans DMSO.

### **6.22.1 Pour le stockage des échantillons de sédiment**

Pour le stockage des sédiments après l'échantillonnage, l'usage de sacs ou récipients en polyéthylène haute densité est recommandé. Pour la fraction destinée à l'analyse des HAPs et PCBs (1,3 litres de sédiment humide), on utilise des contenants en verre ambré avec des bouchons en teflon®.

### **6.22.2 Pour le stockage des extraits**

- Bouteilles en verre ambré pour les extraits(eau interstitielle, extrait aqueux et organique) pour les bioessais stockés à 4°C : maximum 9l.
- 2 bouteilles en HDPE de X ml pour l'extrait par eau régal et l'eau interstitielle pour l'analyse des métaux stocké à -20°C :
- 1 bouteille en Verre ambré de X ml pour l'eau interstitielle avec bouchon garnie de teflon® pour l'analyse de l'ammonium stocké à -20°C.
- 4 bouteilles de Verre ambré de X ml avec bouchon garnie de teflon ou d'aluminium pour l'eau interstitielle et l'extrait organique pour l'analyse des PCBs et HAPs.

## **6.23 Tests écotoxicologiques**

### **6.23.1 Mesure des caractéristiques physico-chimiques des échantillons**

Les mesures des principaux paramètres important pour la survie et la croissance des organismes d'essais : oxygène dissoud, pH, électroconductivité, on été faits le premier jour d'essai soit le 29 octobre 2009. ces mesures on aussi été faite la fin de chaque série de test avec *Daphnia magna*.

**Microtox®** Les tests Microtox® ont eu lieu les 29 octobre et 3 novembre 2009.

Les critères de validé suivant doivent être respectés :

- Le facteur de correction doit être supérieur à 70%.
- La variabilité de la luminescence initiale doit être inférieure inférieure à 20%.
- Les essais sur des standard toxique sont compris dans un intervalle définie par une norme internationale reconnue.

Echantillon	Température en °C	pH	Eh en $\mu\text{S}/\text{cm}$
Extrait aqueux 1	25	7.06	202
Extrait aqueux 2	25	7.29	216
Eau de porosité 1	25	7.67	442
Eau de porosité 2	25	7.54	541
Contrôle	25	6.51	646

TABLE 32: Mesures des paramètres physico-chimiques des échantillons à la fin du premier test avec *Daphnia magna*

Echantillon	Température en °C	pH	Oxygène dissoud en mg/l	Eh en $\mu\text{S}/\text{cm}$
Blanc au DMSO à 8‰	25	6,99	7,10	650
Extrait organique 1 à 8‰	25	6,81	4,16	601
Extrait organique 2 à 8‰	25	6,8	4,43	597
Contrôle 1	25	6,88	7,10	650
Extrait organique 2 à 4‰	25	6,68	4,65	594
Extrait organique 2 à 2,5‰	25	6,89	5,20	596
Extrait organique 2 à 1‰	25	6,97	6,82	600
Extrait organique 2 à 0.5‰	25	7,08	7,34	612
Contrôle 2	25	6,91	7,17	635

TABLE 33: Mesures des paramètres physico-chimiques des échantillons à la fin des tests sur extraits organiques avec *Daphnia magna*

Toxique de référence	$IC_{50}$ attendue	$IC_{50}$ calculée et [intervalle de confiance à 95%]
$ZnSO_4^{2-}$	entre 3 et 10 mg/l	3,078 mg/l [2,804 ; 3,378]
phénol	entre 13 et 40 mg/l	33,3705 mg/l [30,729 ; 36,24]

TABLE 34: Résultats du test Microtox® sur les standard toxique

Les deux premiers points sont vérifiés pour tous les tests et peuvent être trouvés dans les feuilles de résultats Microtox®. les standards toxiques utilisés sont le phénol et le zinc (sous forme de sulfate de zinc  $ZnSO_4^{2-}$ ). Les valeurs recommandées par la norme AFNOR T90-320 et les résultats obtenues en laboratoire sont inscrits dans le tableau 34. Les critères sont bien respectés pour le lot de réactif bactérien utilisé

Pour les différents tests, les concentrations suivantes ont été utilisées :

- Pour Aq1, Aq2, POR1 et POR2 : 83.33%, 66.66%, 50% et 33.33%.
- Pour le blanc au DMSO, Xt1 et Xt2 : 4.091‰, 2.045‰, 1.023‰ et 0.511‰.

### Daphnia magna

- Pour POR1 et POR2 : 100%, 80% et 60%.
- Pour Aq1 et Aq2 : 100%
- Pour Xt1 : 8‰, 6‰, 4‰.
- Pour Xt2 : 8‰, 6‰, 4‰ (2 fois), 2‰, 1‰, 0,5‰.
- Pour le blanc au DMSO : 8‰, 6‰.

### Rotifères

- Pour POR1 : 90% et 60%.
- POR2 : 90%, 60% et 40%.
- Pour Aq1 et Aq2 : 90%
- Pour Xt1 : 2‰, 1‰, 0,3‰.
- Pour Xt2 : 2‰, 1‰, 0,3‰
- Pour le blanc au DMSO : 2‰, 1‰.

### Ceriodaphnia

- Pour POR1 : 90% et 60%.
- Pour POR2 : 90%, 60% et 45%.
- Pour Aq1 et Aq2 : 90%
- Pour Xt1 : 0,1‰, 0,03‰.
- Pour Xt2 : 0,1‰, 0,03‰.
- Pour le blanc au DMSO : 0,1‰.

### Algues vertes

- Pour Xt1 et Xt2 : 4‰, 3‰, 2‰ et 1‰.



- Pour le blanc au DMSO : 4‰, 3‰.  
résultats calculées avec regtox :  $Xt1$ ,  $CE_{20}$  : 0,552% avec l'intervalle de confiance à 95% [0,358% ; 603%]  $Xt2$ ,  $CE_{20}$  : 0,462% avec l'intervalle de confiance à 95% [0,361% ; 1498%]

**Lemna minor**

- Pour POR1 et POR2 : 100%, 75% et 50%.
- Pour Aq1 et Aq2 : 100%

## 7 Liste de matériel et réactifs

### 7.1 Pour l'échantillonnage

#### 7.1.1 Matériel

- Benne ponar.
- Bac (PP) pour récupérer le contenu de chaque benne.
- Pelle PP pour prélevé la partie supérieur de chaque sous-échantillon.
- Bac PP permettant de récolter tout les sous-échantillons et l'homogénéisation à la main ( pour 10L de sédiments humide).
- Entonnoir PP.
- Récipient en HDPE : max 8l(eau interstitielle, 2 extraits pour bioessais), 100ml (métaux par eau régale), 150ml (eau intestitielle pour métaux a congeler), 200ml pour caractérisation physique, 150ml pour soufre total.
- Récipients en aluminium ou verre ambré (pour HAPs et PCB), 1,2 litres.
- Glacière, sacs plastiques, glace, thermomètre.
- Sonde pH, Eh et  $O_2$ .
- Etiquette et stylo indélébile.

### 7.2 Pour l'extraction

#### 7.2.1 Matériel

- Bouteilles en verre ambré pour les extraits(eau interstitielle, extrait aqueux et organique) pour les bioessais stocké à 4°C : maximum 9l.
- 2 bouteilles en HDPE de X ml pour l'extrait par eau régale et l'eau interstitielle pour l'analyse des métaux stocké à -20°C :
- 1 bouteilles en Verre ambré de X ml pour l'eau interstitielle avec bouchon garnie de teflon® pour l'analyse de l'ammonium stocké à -20°C.
- 4 bouteilles de Verre ambré de X ml avec bouchon garnie de teflon ou d'aluminium pour l'eau interstitielle et l'extrait organique pour l'analyse des PCB et HAPs.
- Centrifugeuse 1l réfrigéré, résipient HDPE.
- 2mm pour sédiment fin ou 0,5mm pour la plupart des jeunes amphipodess ou 0,25mm pour toute la macrofaune.
- Rotavapeur
- Agitateur horizontal.

#### 7.2.2 réactifs chimiques

- dichlorométhane.
- diméthyle sulfoxyde.
- $HNO_3$  : pour le nettoyage des récipients.
- eau milliQ.
- $NaSO_4^{2-}$ .

## Références

- [1] F. Abbondanzi, T. Campisi, M. Focanti, and A. Guerra, R. and Iacondini. Assessing degradation capability of aerobic indigenous microflora in pah-contaminated brackish sediments. *Marine Environmental Research*, 59(5) :419–434, 2005.
- [2] anonyme. Ein vorfluter soll wieder zum lebendigen gewasser werden ; vier stimmen zu den perspektiven des gewassers ; starke belastung der urtenen bei regenwetter. *GSA Informationsbulletin des Amtes fur Gewasserschutz und Abfallwirtschaft*,, pages 8–25, 2008.
- [3] M. Bombardier and N. Bermingham. The sed-tox index : toxicity-directed management tool to assess and rank sediments based on their hazard concept and application. *Environ. Toxicol. Chem.*, 18 :685–698, 1999.
- [4] M. Bombardier and C. Blaise. Comparative study of the sediment-toxicity index, benthic community metrics and contaminant concentrations. *Wat. Qual. Res. J.*, 35(4) :735–780, 2000.
- [5] M. Campbell, G. Bitton, B. Koopman, and J. J. Delfino. Preliminary comparison of sediment extraction procedures and exchange solvents for hydrophobic compounds based on inhibition of bioluminescence. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 7(4) :329–338, 1992.
- [6] Environnement Canada. Méthode d’essai biologique : essai de reproduction et de survie sur le cladocère *Ceriodaphnia dubia*, 1992.
- [7] Environnement Canada. Méthode d’essai biologique : essai d’inhibition de la croissance de l’algue d’eau douce *Selenastrum capricornutum*, 1997.
- [8] Environnement Canada. Méthode d’essai biologique : méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d’effluents chez *Daphnia magna*, 2000.
- [9] Environnement Canada. Méthode d’essai biologique : méthode de référence servant à déterminer la toxicité des sédiments à l’aide d’une bactérie luminescente dans une essai en phase solide, 2002.
- [10] Environnement Canada. Méthode d’essai biologique : essai de mesure de l’inhibition de la croissance de la plante macroscopique dulcicole *Lemna minor*, 2007.
- [11] P. M. Chapman and H. Hollert. Should the sediment quality triad become a tetrad, a pentad, or possibly even a hexad ? *Journal of Soils and Sediments*, 6(1) :4–8, 2006.
- [12] L. Clausen, N.P. Arildskov, J. Larsen, F. and Aamand, and H.-J. Albrechtsen. Degradation of the herbicide dichlobenil and its metabolite bam in soils and subsurface sediments. *Journal of Contaminant Hydrology*, 89(3-4) :157–173, 2007.
- [13] L. Cleveland, E. Little, and J. Petty. Toxicological and chemical screening of antarctica sediments : Use of whole sediment toxicity tests, microtox, mutatox and semipermeable membrane devices (spmds). *Marine Pollution Bulletin*, 34(3) :194–202, 1997.
- [14] A. Cottenie and M. Verloo. *Chemical analysis of plants and soils*. Ghent, Brussels, 1982.

- 
- [15] A. De la Torre, J. Jimenez, M. Carballo, and C. Fernandez. Ecotoxicological evaluation of pig slurry. *Chemosphere*, 41(10) :1629–1635, 2000.
- [16] H. J. De Lange, C. Van Griethuysen, and A. A. Koelmans. Sampling method, storage and pretreatment of sediment affect avs concentrations with consequences for bioassay responses. *Environmental Pollution*, 151(1) :243–251, 2008.
- [17] S. De Rosemond and K. Liber. Wastewater treatment polymers identified as the toxic component of a diamond mine effluent. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(9) :2234–2242, 2004.
- [18] D. Di Toro, J. D. Mahony, and D. Hansen. Acid volatile sulfide predicts the acute toxicity of cadmium and nickel in sediments. *Environmental Science and Technology*, 26(1) :96–101, 1992.
- [19] J. M. Dorioz, E. Pilleboue, and A. Ferhi. Dynamique du phosphore dans les bassins versants : Importance des phénomènes de rétention dans les sédiments. *Water Research*, 23(2) :147–158, 1989.
- [20] K. Emerson and R.C. Russo. Aqueous ammonia equilibrium calculation : effect of ph and temperature. *J. Fish. Res. Board Can.*, 32 :2379–2383, 1975.
- [21] Stuart G. Fisher, James B. Heffernan, Ryan A. Sponseller, and Jill R. Welter. Functional ecomorphology : Feedbacks between form and function in fluvial landscape ecosystems. *Geomorphology*, 89(1-2) :84–96, 2007.
- [22] A. Frutiger. Méthodes d’analyse et d’appréciation des cours d’eau : Macrozoobenthos niveau r, 2005.
- [23] B. Garban, D. Ollivon, M. Poulin, V. Gaultier, and A. Chesterikoff. Exchanges at the sediment-water interface in the river seine, downstream from paris. *Water Research*, 29(2) :473–481, 1995.
- [24] P. Gillis, P. Chow-Fraser, J. Ranville, and P. Ross. Daphnia need to be gut-cleared too : the effect of exposure to and ingestion of metal-contaminated sediment on the gut-clearance patterns of d. magna. *Aquatic Toxicology*, 71(2) :143–154, 2005.
- [25] J. Guthruf, V. Maurer, and K Guthruf. Renaturierung urtenen holzmuhle 2004-2007 erfolgskontrolle 2008. Technical report, Hydra Angewandte hydrologie, 2009.
- [26] L. Guzzella. Comparison of test procedures for sediment toxicity evaluation with vibrio fischeri bacteria. *Chemosphere*, 37(14-15) :2895–2909, 1998.
- [27] P. Gy. *L’échantillonnage des lots de matière en vue de leur analyse*. Masson, Paris, 1996.
- [28] L.C. D. Hong, K. Becker-van Slooten, J.J. Sauvain, T.L. Minh, and J. Tarradellas. Toxicity of sediments from the ho chi minh city canals and saigon river, viet nam. *Environmental Toxicology*, 15(5) :469–475, 2000.
- [29] P. Hsu, A. Matthai, S. Heise, and W. Ahlf. Seasonal variation of sediment toxicity in the rivers dommel and elbe. *Environmental Pollution*, 148(3) :817–823, 2007.
- [30] B. Johnson and E. Long. Rapid toxicity assessment of sediments from estuarine ecosystems : a new tandem in vitro testing approach. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17(6) :1099–1106, 1998.

- 
- [31] A.A. Koelmans, W. Gillissen, F. and Makatita, and M. Van Den Berg. Organic carbon normalisation of pcb, pah and pesticide concentrations in suspended solids. *Water Research*, 31(3) :461–470, 1997.
- [32] T. Kose, T. Yamamoto, A. Anegawa, S. Mohri, and Y. Ono. Source analysis for polycyclic aromatic hydrocarbon in road dust and urban runoff using marker compounds. *Desalination*, 226(1-3) :151–159, 2008.
- [33] E. R. Long and D. D. MacDonald. Recommended uses of empirically derived, sediment quality guidelines for marine and estuarine ecosystems. *Human and Ecological Risk Assessment (HERA)*, 4(5) :1019–1039, 1998.
- [34] D. MacDonald and Ingersoll. C. A guidance manual to support the assessment of contaminated sediments in freshwater ecosystems, 2002.
- [35] D. MacDonald, C. Ingersoll, and T. Berger. Development and evaluation of consensus-based sediment quality guidelines for freshwater ecosystems. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 39(1) :20–31, 2000.
- [36] Donald D. Macdonald, R. Scott Carr, Fred D. Calder, Edward R. Long, and Christopher G. Ingersoll. Development and evaluation of sediment quality guidelines for florida coastal waters. *Ecotoxicology*, 5(4) :253–278, 1996.
- [37] Donald D. MacDonald, Lisa M. Dipinto, Jay Field, Christopher G. Ingersoll, Edward R. Lvong, and Richard C Swartz. Development and evaluation of consensus-based sediment effect concentrations for polychlorinated biphenyls. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(5) :1403–1413, 2000.
- [38] J. Margot. *Impacts des déversoirs d'orage sur les cours d'eau. Application de la méthodologie STORM et validation par le biais d'analyses écotoxicologiques et chimiques*. PhD thesis, 2008.
- [39] A. Massoudieh, F.A. Bombardelli, and T.R. Ginn. A biogeochemical model of contaminant fate and transport in river waters and sediments. *Journal of Contaminant Hydrology*, In Press, Corrected Proof.
- [40] ASTM (American Society for testing and Materials). Standard guide for designing biological tests with sediments, 2001a.
- [41] ASTM (American Society for testing and Materials). Standard guide for determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates., 2001b.
- [42] D. I. Mount and T. J. Norberg. A seven-day life cycle cladoceran toxicity test. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 3(3) :425–434, 1984.
- [43] Amy M. P. Oen, G. Cornelissen, and G. Breedveld. Relation between pah and black carbon contents in size fractions of norwegian harbor sediments. *Environmental Pollution*, 141(2) :370–380, 2006.
- [44] M Pardos, C Benninghoff, RL. Thomas, and S. Khim-Heang. Confirmation of elemental sulfur toxicity in the microtox ; assay during organic extracts assessment of freshwater sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18(2) :188–193, 1999.
- [45] M. Pardos, Houriet J.-P., and J. Dominik. Micropolluants dans les sédiments, 2003.

- 
- [46] P Perret. Zustand der schweizerischen fliessgewasser in den jahren 1974/1975, 1977.
- [47] W. Rauch, V. Krejci, and W. Gujer. Rebeka—a software tool for planning urban drainage on the basis of predicted impacts on receiving waters. *Urban Water*, 4(4) :355–361, 2002.
- [48] L. Rossi, L. De Alencastro, T. Kupper, and J. Tarradellas. Urban stormwater contamination by polychlorinated biphenyls (pcbs) and its importance for urban water systems in switzerland. *Science of The Total Environment*, 322(1-3) :179–189, 2004.
- [49] S. Santiago, K. Becker Van Slooten, N. Chèvre, and M. Pardos. Guide pour l’utilisation des tests écotoxicologiques avec les daphnies, les bactéries luminescentes et les algues vertes, appliqués aux échantillons de l’environnement. Technical report, Soluval Santiago, Institut Forel, Ecole Polytechnique Fédéral de Lausanne, 2002.
- [50] R.P. Scroggins. Document d’orientation sur le prélèvement et la préparation de sédiments en vue de leur caractérisation physicochimique et d’essai biologiques, 1994.
- [51] S. Smith and D. MacDonald. Protocole pour l’élaboration de recommandations pour la qualité des sédiments en vue de la protection de la vie aquatique, 1999.
- [52] T. Snell, B. Cochrane, and R. Irby. Effects of copper and tributyltin on stress protein abundance in the rotifer brachionus plicatilis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C : Comparative Pharmacology*, 98(2-3) :385–390, 1991.
- [53] H. Soclo, P. Garrigues, and M. Ewald. Origin of polycyclic aromatic hydrocarbons (pahs) in coastal marine sediments : Case studies in cotonou (benin) and aquitaine (france) areas. *Marine Pollution Bulletin*, 40(5) :387–396, 2000.
- [54] C. Stewart and C. Conwell. Temporal changes in contaminated sediment : a neglected aspect of ecological risk assessment. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 4(4) :517–519, 2009.
- [55] R. C. Swartz. Consensus sediment quality guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18(4) :780–787, 1999. Cited By (since 1996) : 81 Export Date : 9 January 2010 Source : Scopus.
- [56] M. Tarkpea, M. Hansson, and B. Samuelsson. Comparison of the microtox test with the 96-hr lc50 test for the harpacticoid nitocra spinipes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 11(2) :127–143, 1986.
- [57] L. Vigano. Assessment of the toxicity of river po sediments with ceriodaphnia dubia. *Aquatic Toxicology*, 47(3-4) :191–202, 2000.
- [58] R. Wenning, G. Batley, C. Ingersoll, and D. Moore. *Use of sediment quality guidelines and related tools for the assessment of contaminated sediments*. Society of Environmental toxicology and chemistry (SETAC), 2002.